

**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ÜROLOJİ ANABİLİM DALI**

**AZOOSPERMİK BİREYLERDE, SEMİNAL PLAZMA
OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ
AZOOSPERMİK OLMAYAN BİREYLERDEN FARKLI
MİDİR ?**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Kemal GÜMÜŞ

**DANIŞMANLAR
Prof. Dr. Ercan YENİ
Doç. Dr. Mehmet GÜLÜM**

Bu tez, Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu tarafından 13144 proje numarası ile desteklenmiştir

**ŞANLIURFA
2014**

TEŞEKKÜR

Harran Üniversitesi Tıp Fakóltesi Üroloji Anabilim Dalında yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr. Ercan YENİ, Prof. Dr. Ayhan VERİT, Doç. Dr. Murat SAVAŐ, Doç. Dr. Halil ÇİFTÇİ, Doç. Dr. Mehmet GÜLÜM ve Yrd. Doç. Dr. Yiđit AKIN'a; Anabilim dalında birlikte çalıştđđım meslektaşlarım Op. Dr. Halil Felat ÖNCEL, Op. Dr. Adem ALTUNKOL, Op. Dr. Mazhar UTANĞAÇ, Op. Dr. Bülent ÇELEPKOLU, Op. Dr. İsmail YAĞMUR, Dr. Mehmet DEMİR ve Dr. Mehmet Ođur YILMAZ'a, klinik sekreterleri Mahmut Gazi ŐAŐMAZ ve Harun ASLANOđLU'na; tezimin sečilme aşamasında ve hazırlanma aşamalarında her türlü yardımda bulunan sayın hocam Prof. Dr. Ercan YENİ ve Doç. Dr. Mehmet GÜLÜM'e,

Tezimin çalışma aşamasında yardım eden Tıbbi Biyokimya kliniğinden sayın Prof. Dr. Nurten AKSOY'a, laboratuvar çalışmaları esnasında yardımlarından dolayı Biyokimya AD. çalışanlarına Yrd. Doç. Dr. Hakim ÇELİK ve Öğr. Gör. Abdullah TAŐKIN'a, yardımları ve destekleri için teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince çok büyük yardımlarını gördüğüm aileme, her türlü desteğiyle yanımda olan sevgili eşim Zeynep'e ve oğlum Mustafa Taha'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Kemal GÜMÜŞ

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
SİMGELER ve KISALTMALAR	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VII
TABLolar DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	XI
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. İnfertilite	4
2.2. Erkek Faktör İnfertilitede Etiyolojik Nedenler	5
2.2.1. Pretestiküler Nedenler	5
2.2.2. Testiküler Nedenler	5
2.2.3. Posttestiküler Nedenler	6
2.3. Erkekde Fertilite İle İlişkili Fizyolojik Süreçler	6
2.3.1. Hipotalamo-Hipofizer-Gonadal Eksen	6
2.3.2. Testisler	7
2.3.2.1. Leyding Hücreleri	8
2.3.2.2. Seminifer Tübüller	9
2.3.2.3. Sertoli Hücreleri	10
2.3.2.4. Germinal Hücreler	10
2.4. Spermatogenez	10
2.4.1. Spermatogenezin Genetik Özellikleri	11
2.4.2. Endokrin Faktörler	12
2.4.3. Diğer Faktörler	13
2.5. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi	13
2.5.1. Anamnez	14
2.5.2. Fizik Muayene	15
2.5.3. Semen Analizi	15
2.5.3.1. Semen Toplanması	16
2.5.3.2. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi	16
2.5.3.3. Semen Mikroskopik Değerlendirilmesi	18
2.5.4. Endokrin İnceleme	22
2.5.5. Ejakulasyon Sonrası İdrarda Sperm Aranması	23
2.5.6. Radyolojik Değerlendirme	23
2.5.7. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler	24
2.5.8. Genetik Araştırma	24
2.6. İnfertilite Tedavisi	25
2.6.1. Erkek İnfertilitesinde Medikal Tedavi	25
2.6.1.1. Spesifik Tedavi	25
2.6.1.2. Ampirik Tedavi	27
2.6.2. Erkek İnfertilitesinde Cerrahi Tedavi	30
2.6.2.1. Varikosel Tedavisi	31
2.6.2.2. Obstruktif İnfertilitenin Tedavisi	31
2.6.3. Üremeye Yardımcı Teknikler	31
2.6.3.1. İntrauterin İnseminasyon	31
2.6.3.2. İnvitro Fertilizasyon	32
2.6.3.3. İntra Sitoplazmik Sperm İnjesiyonu	32
2.7. Serbest Oksijen Radikalleri	33

2.8. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücreye Zararlı Etkileri	35
2.8.1. Oksidatif Stres Göstergeleri	35
2.8.1.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu	35
2.8.1.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu	36
2.8.1.3. DNA Oksidasyonu	36
2.8.2. Nitroztatif Stres Göstergeleri	37
2.8.2.1. Nitrik Oksit	37
2.8.2.2. Nitrotirozin	37
2.9. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları	37
2.9.1. Antioksidan Etki Tipleri	37
2.9.1.1. Toplayıcı etki (Scavenging etki)	37
2.9.1.2. Bastırıcı etki (Quencher etki)	38
2.9.1.3. Zincir kırıcı (Chain-breaking etki)	38
2.9.1.4. Onarıcı etki (Repair etki)	38
2.9.2. Antioksidan Sistemler	38
2.9.3. Enzimatik Antioksidanlar	39
2.9.3.1. Süperoksit Dismutaz	39
2.9.3.2. Katalaz	39
2.9.3.3. Glutatyon Peroksidaz	40
2.9.3.4. Glutatyon S- Transferaz	40
2.9.3.5. Glutatyon Redüktaz	40
2.9.3.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz	41
2.9.4. Total Antioksidan	41
2.9.5. Paraoksonaz-1 Enzimi	41
2.9.5.1. Paraoksonaz-1 Enziminin Yapısı	42
2.9.5.2. Paraoksonaz-1 Enzim Fonksiyonu	42
3. GEREÇ ve YÖNTEM	44
3.1. Gereçler	44
3.2. Yöntem	45
3.3. Analitik Metodlar	46
3.3.1. Total Oksidatif Stres Düzeyi	46
3.3.2. Total Antioksidan Seviye Ölçümü	46
3.3.3. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü	47
3.3.4. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü	47
3.3.5. Arilesteraz Enzim Aktivitesi Ölçümü	47
3.4. İstatiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
5. TARTIŞMA	50
6. SONUÇ	52
7. KAYNAKLAR	53

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ABP	Androjen Bağlayan Protein
ASA	Anti Sperm Antikoru
ATP	Adenozin Tri Fosfat
AZF	Azoospermi Faktörü
β	Beta
cAMP	Siklik Adenozin Mono Fosfat
CAT	Katalaz
CBAVD	Konjenital Bilateral Vaz Deferenans Yokluğu
Cu	Bakır
Ca	Kalsiyum
ÇDYA	Çoklu Doymamış Yağ Asiti
DHT	Dihidrotestosteron
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
DK	Dien Konjugatı
EGF	Epidermal Büyüme Faktörü
Fe	Demir
FSH	Folikül Stimüle Edici Hormon
GnRH	Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
GSH-Px	Glutatyon Peroksidaz
GSH-R	Glutatyon Redüktaz
hCG	İnsan Koryonik Gonadotropin
hMG	İnsan Menapozal Gonadotropin
HDL	Yüksek Dansiteli Lipoprotein
ICSI	İntra Sitoplazmik Sperm İnjesiyonu
IgA1	İmmünglobulin A1
IGF-1	İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü
IUI	Intra Uterin İnseminasyon
IVF	In Vitro Fertilizasyon
kDa	Kilo Dalton

L	Litre
LH	Luteinize Edici Hormon
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOO	Lipit Peroksit
LOOH	Lipit Hidro Peroksit
M	Molarite
MDA	Malondialdehit
Mg	Miligram
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
µl	Mikrolitre
mM	Milimolar
µmol	Mikromol
mU	Mili Ünite
ng	Nanogram
nm	Nanometre
NO	Nitrik Oksit
NOS	Nitrik Oksit Sentaz
NT	3-Nitrotirozin
OPU	Oosit Pick Up
PgE	Prostoglandin E
PgF	Prostoglandin F
PON	Paraoksonaz
PSA	Prostat Spesifik Antijen
PAF-AH	Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz
RNA	Ribo Nükleik Asit
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
SDI	Sperm Deformite İndeksi
SOD	Süperoksit Dismutaz
SCOS	Sertoli Cell Only Sendrom
SRY	Y-kromozomu Seks Belirleyici Bölgesi
T	Testosteron
TAS	Total Antioksidan Seviye
TBA	Tiyobarbitürik Asit

TBARS	Tiyobarbitürük Asit Reaktif Madde
TDF	Testis Farklılaştırıcı Faktör
TeBG	Testesteron Östradiol Bağlayıcı Globulin
TESE	Testiküler Sperm Eldesi
TOS	Total Oksidan Seviye
TRUS	Trans Rektal Ultrasonografi
TUR-ED	Trans Üretral Rezeksiyon Ejekülatuar Kanal
TZI	Teratozoospermi İndeksi
ÜYT	Üremeye Yardımcı Teknikler
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
Yq	Y-kromozomu Uzun Kolu
4-HNE	4-Hidroksi-2- Nonenal
8-OHdG	8-Hidroksi-2'- Deoksiguanozin

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Hipotalamo-Hipofiz-Gonadal eksen	7
Şekil 2. İnsan testisinde seminifer tübüller, epididimler ve duktus deferentesler	9
Şekil 3. Spermatogenez	11
Şekil 4. Spermin morfolojik özellikleri	20
Şekil 5. Normal ve defektli sperm formları	22

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. WHO 2010 semen analizi referans aralığı	16
Tablo 2. Kruger kesin kriterine göre sperm morfolojisi	21
Tablo 3. Azoospermik ve non azoospermik gruplarda seminal plazma oksidatif/antioksidatif parametreler	48
Tablo 4. Azoospermik ve non azoospermik gruplarda kan lipid profili ve serum oksidatif/antioksidatif parametreleri	49

ÖZET

AZOOSPERMİK BİREYLERDE, SEMİNAL PLAZMA OKSİDATİF STRES PARAMETRELERİ AZOOSPERMİK OLMAYAN BİREYLERDEN FARKLI MIDIR?

Dr. Kemal GÜMÜŞ
Üroloji Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi

Amaç: Bu çalışmamızın amacı azoospermik bireylerde, seminal plazma oksidatif stres parametrelerinin azospermik olmayan bireylerin sonuçları ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: Çalışmamıza Kasım 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı Polikliniğine, infertilite nedeniyle başvuran ardışık 200 hasta alındı. Hastalardan spermiogram ve 12 saatlik açlık sonrası kan alındı. Semende anlamlı düzeyde lökosit tespit edilen hastalar; 40 yaş üstü, VKI >30, varikosel, epididimiorşit, testiküler torsiyon, testis travması ve tümörü olan hastalar; pentoksifilin, vitamin preparatları ve sigara kullanan hastalar çalışma dışı bırakıldı. Azoospermik ve nonazoospermik olmak üzere 2 gruba ayrıldı. Azoospermik grupta 48 hasta (ortalama yaş 32.40±8.01 yıl), nonazoospermik grupta 137 hasta (ortalama yaş 30.58±5.77 yıl) değerlendirmeye alındı. Azoospermik ve nonazoospermik hastaların serum ve seminal plazma TAS, TOS, OSI, PON ve Arilesteraz düzeylerine bakıldı.

Bulgular: Azoospermik ve nonazoospermik gruplarda TAS, TOS, OSI, PON, arilesteraz seviyeleri incelendiğinde; azoospermik olmayan grupta TAS, PON, arilesteraz değerlerinin azoospermik gruptaki değerlerden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu TOS ve OSI değerlerinin düşük olduğu bulundu. Bütün farklar istatistiksel olarak anlamlıydı. Nonazoospermik grupta semen hacmi ile OSI arasında negatif korelasyon belirlendi ($r = -0.345$, $P < 0.005$). Oksidasyonun diğer parametreleri ile herhangi bir anlamlı ilişki saptanmadı. Mililitrede sperm sayısı ile PON ($r = 0.409$, $P < 0.001$) ve arilesteraz ($r = 0.466$, $P = 0.000$) arasında pozitif korelasyon belirlendi. Çalışılan diğer parametreler ile anlamlı bir ilişki bulunamadı. Motilite ile sadece OSI arasında negatif korelasyon bulundu ancak bu ilişki istatistiksel olarak

anlamli değildi ($r=-0.64$ $P=0.586$). Morfoloji ile OSI arasında negatif korelasyon belirlendi ($r=-.335$, $P<0,005$) . Morfoloji ile diğer parametreler arasında ise başka bir ilişki saptanmadı.

Sonuç: Azoospermik bireyler diğer oligo ve normospermik infertil bireylere göre daha fazla serum ve seminal plazma oksidatif stres paterni göstermektedirler. Seminal örneklerden oluşan azoospermik grubumuzdaki yüksek TOS ve OSI seviyelerinin varlığı bulgusu semende oksidatif stresi oluşturan başlıca faktörlerin lökosit ve/veya immatür, hasarlı sperm hücreleri olduğu yönündeki mevcut bilginin sorgulanması gerektiğini, seminal oksidatif dengeyi bozabilen başka sebeplerinde olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuyla ilgili daha geniş katılımlı ve iyi düzenlenmiş çalışmaların yapılması gerekmektedir.

Anahtar Kelime: İnfertilite, Azoospermi, Oksidatif Stres, TAS, TOS.

ABSTRACT

SEMINAL PLASMA OXIDATIVE STRESS PARAMETERS IS DIFFERENT FROM AZOOSPERMIA AND NON AZOOSPERMIA INDIVIDUALS ?

Kemal GÜMÜŞ, MD

Specialty Thesis, Department of Urology

Aim: In this study, we aimed to compare oxidative parameters in seminal plasma with azoospermia people to non azoospermia people.

Method: 200 patients who diagnosed for infertility were recruited through Harran University Research Hospital Urology outpatient service from 2013 November to 2014 May. Spermogram and 12 hours fasting blood sample were taken from patients. Significant leukocytes were determined in patients' semen who had varicosele, BMI>30, epididymoorchitis, testicular torsion, testicular trauma, patients with tumor and older than 40 years. Patients who were using pentoksifilin, vitamin, and cigarette were excluded. Patients divided into two groups; azoospermia and non-azoospermia. 48 patients in azoospermia group (mean age 32.40±8.01 years) and 137 patients in non-azoospermia group (mean age 30.58±5.77 years) were evaluated. TAS, TOS, OSI, PON and arylesterase levels were measured in serum and seminal plasm in both groups.

Results: When TAS, TOS, OSI, PON and arylesterase levels were evaluated in both group; It's found that patients with non-azoospermia group have higher levels of TAS, PON, Arylesterase compared to the other group. All differences were statistically significant. In non-azoospermia group, semen volume was inversely correlated with OSI levels ($r = -0.345$, $P < 0.005$). There were no correlation with other oxidative parameters. The number of sperm per milliliter were correlated with PON ($r = 0.409$, $P < 0.001$) and arylesterase ($r = 0.466$, $P = 0.000$). There were no correlation with other parameters. We found negative correlation between motility and OSI but it wasn't statistically significant ($r = -0.64$, $P = 0.586$) and also found negative correlation between morphology and OSI ($r = -0.335$, $P < 0,005$). There were no association between morphology and other parameters.

Conclusions: Infertile patients with azoospermia indicated higher serum and seminal oxidative pattern compared to infertile people with oligo- and normospermia. In azoospermia group, higher TOS, OSI levels were required to consider the information that leukocytes and/or immature, damaged sperm cells in semen were the main factor which create oxidative stress and there may be any other factors which contribute to this situations. Further investigation with larger patient populations is needed.

Keywords: Infertility, Azoospermia, Oxidative stress, TAS, TOS

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İnfertilite, çocuk isteyen bir çiftin korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl içerisinde gebelik elde edememesi olarak tanımlanmaktadır. Toplumdaki sıklığı yaklaşık %15 olarak rapor edilmiştir. Olguların 1/3'ünde erkek faktör 1/3'ünde kadın faktör tek başına sorumlu bulunurken yaklaşık 1/3'ünde de çiftlerin her ikisinde patoloji mevcuttur. Dolayısıyla, infertil çiftlerin yarısında bir erkek faktörü söz konusudur. İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bozulma ile ortaya çıkar. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Örneğin obstrüksiyon ve hipogonadotropik hipogonadizm tedavi edilebilir patolojiler arasında sayılırken, viral orşite bağlı sekonder bilateral testis atrofişi geri döndürülemez hasardır. Ayrıca, bazı azoospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Eğer semen analizindeki bozulmanın nedeni ortaya konamaz ise “idyopatik infertilite” olarak tanımlanır. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta ve idyopatik infertilite olarak kabul edilmektedir (1).

Son yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron taşıyan atom ve moleküller “serbest radikaller” olarak tanımlanır. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu bileşikler etrafındaki moleküllerle reaksiyona girerek elektron almaya çalışır ve bir an önce kararlı hale ulaşmak ister (2,3). Bu nedenle, çok reaktifler ve pek çok moleküle etkileşerek onları kararsız hale sokup yıkılmalarına neden olurlar (2,3). Aerobik organizmalarda serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır. Reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species; ROS) ve azot kaynaklı radikaller fizyolojik sınırlarda üretildiklerinde sperm matürasyonu, kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynarlar (4,5). Spermatozoalar düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit ile birlikte inkübe edildiğinde sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunun uyarıldığı bildirilmiştir (6). Nitrik oksit (NO) ve süperoksit anyonunun özellikle kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu basamaklarında etkili olduğu ileri sürülmektedir. ROS, sperm-oosit etkileşiminde de rol oynamaktadır (5-7). Fizyolojik rollerinin önemine karşın, serbest radikaller aşırı miktarda üretildiklerinde hücre için yaşamsal tehdit oluşturabilmektedir. Semen matür ve immatür spermatozoaların yanı sıra, spermatogenezin farklı evrelerinden köken alan yuvarlak hücreler, lökositler ve epitel

hücreleri gibi farklı tipte hücreleri de içerir. Bunlar arasında lökositler (nötrofil ve makrofajlar) ve immatür spermatozoalar ROS'un başlıca endojen kaynaklarıdır (5,6). NO ise erkek genital sistemindeki fagositler, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri gibi kaynaklardan köken alır (8). ROS; sigara, alkol, kafein, endüstriyel bileşikler, çevre kirliliği, ağır metaller ve radyasyon gibi etkenlerle ekzojen olarak da oluşabilmektedir (9). Sigaranın seminal plazmada antioksidan kapasiteyi azalttığı, potansiyel bir ROS kaynağı olan lökosit sayısını %48 oranında arttırdığı ileri sürülmüştür (9). İdyopatik infertilite, spinal kord yaralanmaları, varikozel ve genitoüriner enfeksiyon gibi patolojilerde de semende ROS'un arttığı bildirilmiştir (5,9-13). Lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi bütün hücrel komponentler ROS'un potansiyel hedefidir. Bu makromoleküller arasında özellikle lipitler oksidatif ataklara en açık olan gruptur. Memeli spermi çoklu doymamış yağ asidinden (ÇDYA) zengindir ve çift bağların mevcudiyeti bu yapıyı oksidatif hasara oldukça duyarlı kılar (5,14). Sperm membranında yer alan ÇDYA'nin yaklaşık yarısı 6 adet çift bağ içeren dekozaheksanoik asittir. Lipit membranlarındaki ÇDYA'larında başlayan peroksidasyon reaksiyonu bir zincir şeklinde ilerleyerek membran yapısını, akışkanlığını, iyon gradiyentini, reseptör transdüksiyonunu, transport ve membran enzimlerini etkileyebilir (5). Spermin motilitesi, yaşam süresi ve fonksiyonları ROS'un neden olduğu lipit peroksidasyonuna bağlı olarak bozulabilir (15). Serbest radikaller doğrudan veya dolaylı etki göstererek proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını bozarlar. Ayrıca, sperm DNA'sına etki ederek baz modifikasyonları, sarmal kırıkları ve kromatin çaprazlaşmalarına neden olarak DNA'nın bütünlüğünü bozabilirler (9). Aşırı miktarda ROS üretimi, hatalı akrozom reaksiyonuna ve spermde motilite ve fertilitate bozukluklarına yol açar (9). Sperm hücrelerinde ROS'a bağlı oluşan hasarın derecesi serbest radikal türüne, miktarına ve serbest radikallere maruz kalma süresine göre değişir. Spermatozoaların aşırı miktarda ROS ile karşılaştığında hasar oluşumunu engelleme veya oluşan hasarı onarma yeteneği son derece kısıtlıdır (9,14). Ayrıca, sitoplazmasında serbest radikalleri toplayıcı enzimlerin düşük konsantrasyonda oluşu spermatozoayı oksidatif ataklara karşı savunmasız kılar.

Seminal plazma erkek üreme yollarındaki bezlerin fizyolojik bir salgısıdır. Seminal plazmayı başlıca seminal veziküllerin, prostat ve bulbouretral bezlerin sıvıları oluşturur. Seminal plazma hormonal, enzimatik ve yüzey modifiye edici olaylar aracılığı ile spermatozoanın matürasyonunda ve taşınmasında önemli rol oynar (16). Bu kompleks karışım türler arasında olduğu gibi aynı tür içindeki erkeklerde de farklılık gösterir. Seminal plazmanın organik komponentleri sperm metabolizmasının, pH ve osmolaritesinin

sürdürülmesinde esastır ve bu komponentler arasında proteinler memelilerde sperm fonksiyonlarına en önemli katkıyı yaparlar. Seminal plazma proteinlerinin çoğu seminal vezikülün sekretuar ürünüdür (16). Seminal plazma ROS ile indüklenmiş hasara karşı spermatozoayı koruyabilmek için güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir (4). Bu koruyucu sistem ROS'a bağlı zincirleme reaksiyonu durduran, oksidan radikalleri toplayan veya nötralize eden antioksidan moleküller içerir. Bu antioksidan moleküller epididim, seminal vezikül ve prostat tarafından lokal olarak sentezlenmektedir. Seminal plazmada bulunan başlıca antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-R) ve katalaz gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra askorbik asit, taurin, hipotaurin, eser elementler ve tiyol grupları gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da seminal plazmanın başlıca bileşenleridir (17,18). Varikoseli olan fertil veya infertil erkeklerin semen örneklerinin değerlendirilmesinde, varikoseli olanlarda olmayanlara göre daha yüksek konsantrasyonlarda ROS bulunduğu bildirilmiştir. İnfertil varikoselli olguların %80' inde artmış ROS konsantrasyonu saptanmasına karşın, bu durum varikoseli olan fertil hastaların %77' sinde, varikoseli olmayan fertil bireylerin %20' sinde bulunmaktadır. Ayrıca, normal bireylerin toplam antioksidan kapasitesi de varikoseli olanlardan anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (19).

Günümüzde oksidatif stres parametreleri birçok patoloji için araştırma konusu haline gelmiştir. Varikoselli erkeklerde lokal ve sistematik olarak serbest oksijen radikallerinde artış gösterilmiştir. Biz bu çalışmamızda varikoseli ve lökospermisi olmayan infertil bireylerin seminal plazmasında paraoksonaz, arilesteraz, total antioksidan seviye (TAS), total oksidan seviye (TOS) ve oksidatif stres indeksini (OSİ) incelemeyi, bu parametreler bağlamında azospermik olan ve azospermik olmayan bireyler arasındaki olası farkları ortaya koymayı ve bu konuda eksikliği bilinen literatüre katkıda bulunmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. İnfertilite

İnfertilite, çocuk isteyen bir çiftin korunmasız düzenli cinsel ilişkiye rağmen bir yıl içerisinde gebelik elde edememesi olarak tanımlanmaktadır. Toplumdaki sıklığı yaklaşık %15 olarak rapor edilmiştir. Olguların 1/3'ünde erkek faktör 1/3'ünde kadın faktör tek başına sorumlu bulunurken yaklaşık 1/3'ünde de çiftlerin her ikisinde patoloji mevcuttur. Dolayısı ile infertilitede erkeğin sorumluluğu %50 olarak kabul edilmektedir (1). İnfertilitede eğer erkeğe ait bir problem söz konusu ise, bu sıklıkla sperm parametrelerinde bir bozulma ile ortaya çıkar. Oysa sperm değerleri normal olsa da cinsel fonksiyon bozuklukları ya da penil deformiteler gibi sorunlarda infertilite nedeni olabilir. Ayrıca, spermin kalitatif bozuklukları da her zaman standart testlerle ortaya çıkarılamayabilir. Özellikle kromatin hasarları, fertilizasyon ve embriyo gelişim bozukluğu durumları da son yıllarda üzerinde sık durulan konular arasındadır. Ortadan kaldırılması ile sağlıklı gebeliklerin elde edilebileceği birçok çevresel faktör, değişik mekanizmalarla spermatozoanın kapasitasyonunu ve neticede oosit ile etkileşimini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Tedaviden yeterli sonuç alınabilmesi için, tanının iyi konması gerekir. Örneğin obstrüksiyon ve hipogonadotropik hipogonadizm tedavi edilebilir patolojiler arasında sayılırken, viral orşite bağlı sekonder bilateral testis atrofisi geri döndürülemez hasardır. Ayrıca, bazı azospermik erkeklerin testislerinde aktif spermatogenez odakları mevcut olup, tedavi ile sperm yapımı uyarılabilir. Eğer semen analizindeki bozulmanın nedeni ortaya konamaz ise "idiopatik infertilite" olarak tanımlanır. Erkek infertilitesinin yaklaşık %40-60'ında altta yatan neden bilinse de birçoğunda etken ortaya konamamakta ve idiopatik infertilite olarak kabul edilmektedir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmaların hız kazanması ile birlikte kromozom anomalileri (örn. Klinifelter sendromu) ve Y kromozom mikrodelsyonları gibi genetik nedenlerin erkek infertilitesindeki yeri giderek önem kazanmaktadır. Oligospermik olan erkeklerde kromozomal problemler %2,2 iken azospermik olanlarda %15 civarındadır (20). Tam değerlendirilmesi neticesinde, düzeltilemeyecek bir patolojiye sahip olduğunun anlaşılması, erkeğin gereksiz ve stres yaratacak uzun tedavi protokolleri içerisine girmesini önler. Böyle çiftler ejakülat spermi ya da epididim veya testislerden elde edilecek spermlerin, in vitro fertilizasyon (IVF) / intrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI)'nda kullanılması ile çocuk sahibi olabilirler. Bütün bunlara ek olarak, altta yatan nedenin genetik olduğunun bilinmesi, doğacak çocuğun maruz kalabileceği anomaliler hakkında ailenin önceden bilgilendirilmesi bakımından son derece

önem taşır. Bütün bu nedenler sonucunda, infertilite olgularında erkeğin ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmesi çok önemlidir. Diğer yandan, sağlıklı bir gebeliğin başarılabilmesi için optimal değerlendirme protokolü içerisinde erkek faktörünün normal bulunmasının yanı sıra kadında ovulasyon, tubaların açıklığı ve fonksiyonel durumu, uterus kavitesinin durumu ile servikal faktörlerin de ortaya konmuş olması gerekir (21).

2.2. Erkek Faktör İnfertilitede Etyolojik Nedenler: (22,23)

2.2.1. Pretestiküler nedenler

2.2.1.1. Hipotalamik hastalıklar

- İzole gonadotropin yetmezliği (Kallman sendromu),
- İzole luteinize edici hormon (LH) yetmezliği,
- İzole folikül stimüle edici hormon (FSH) yetmezliği,
- Konjenital hipogonadotropik hastalık

2.2.1.2. Hipofizer hastalıklar

- Hipofizer yetersizlik (tümörler, infiltratif olay, ameliyat, radyasyon),
- Hiperprolaktinemi,
- Hemokromatozis,
- Eksojen hormonlar (androjen- estrogen, glukokortikoid fazla verilmesi, hipotiroidi-hipertiroidi)

2.2.2. Testiküler nedenler

2.2.2.1. Kromozomal anormallikler

- Klinefelter sendromu, XX erkek, XYY sendromu
- Noonan sendromu (erkek Turner sendromu)

2.2.2.2. Varikosel, travma, orşiepididimit,

2.2.2.3. Bilateral anorşi, kriptorşidizm,

2.2.2.4. Sertoli cell only sendromu (germ hücre aplazisi),

2.2.2.5. Gonadotoksinler (ilaç, radyasyon, alkol, sigara ve uyuşturucu maddeler),

2.2.2.6. Sistemik hastalıklar (böbrek yetmezliği, karaciğer hastalığı, orak hücreli anemi),

2.2.2.7. Androjen sentez veya etki bozuklukları,

2.2.2.8. Myotonik distrofi

2.2.3. Posttestiküler nedenler

2.2.3.1. Sperm transport hastalıkları,

- Konjenital
- Akkiz
- Fonksiyonel

2.2.3.2. Sperm motilite ve fonksiyon bozuklukları,

- Konjenital sperm kuyruk defekti
- Maturasyon defekti
- İmmünolojik hastalıklar
- İnfeksiyon

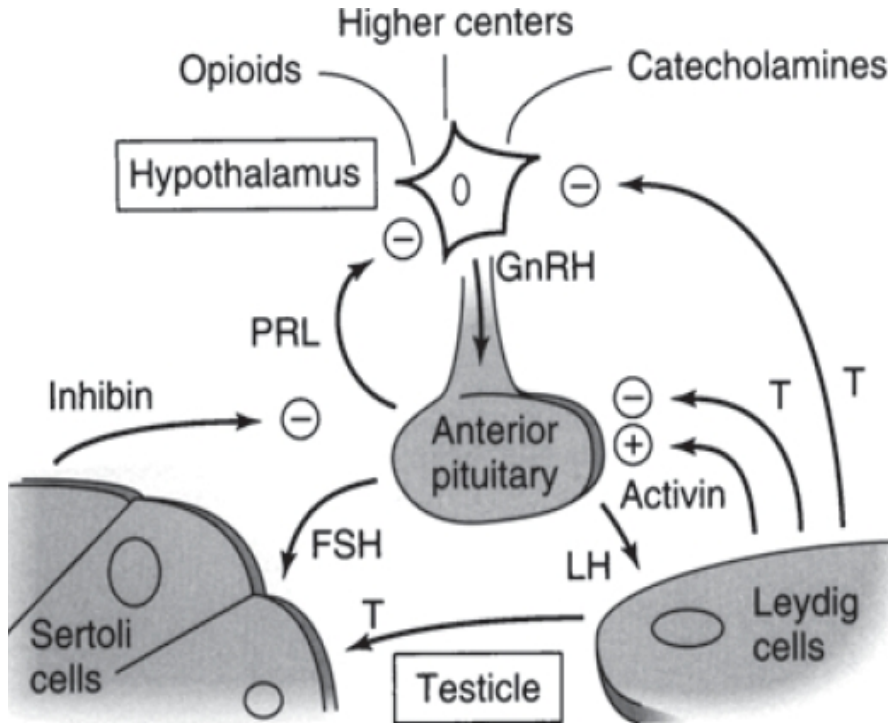
2.3. Erkekte Fertilité İle İlişkili Fizyolojik Süreçler

Testisin iki temel işlevi vardır: i) interstisyel alandaki Leydig hücrelerinden testesteron salgılanması, ii) seminifer tübüllerde spermatogenez ile sperm oluşumunu sağlanması. Testosteron yalnızca sperm üretimi için değil, aynı zamanda sekonder seks karakterlerin gelişmesi ve normal cinsel aktivitenin sürdürülmesi için de gerekli olan bir hormondur. Testosteronun ön hipofizden salgılanan; gonadotrop hormonlar yoluyla kontrol edilir. Normal üreme fonksiyonu, hipotalamo-hipofizer-gonadal eksen adı verilen geri dönüşlü (feedback) kontrol mekanizmasına bağlı olarak sürdürülmektedir (23).

2.3.1. Hipotalamo - Hipofizer - Gonadal Eksen

Gonadotropin Releasing Hormon (GnRH) hipotalamustan salgılanan, hipofiz hormonlarını düzenleyen ve üreme fizyolojisinde önemli rol oynayan bir hormondur. Ön hipofizden LH ve FSH'da GnRH kontrolü altında salgılanır. Stres, egzersiz ve diyetle salınımı değişen GnRH'ın düzenlenmesinde katekolamin, prostaglandin ve testiküler steroidler etkin rol oynarlar. LH ve FSH hormonları hücrel metabolizmayı uyarmak için Leydig ve Sertoli hücrelerindeki reseptörlere bağlanırlar. Daha geniş dolaşım yapan FSH, LH'ya göre daha düşük konsantrasyondadır. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar hem serum FSH hem de LH'da meydana gelen yükselmelerin gonadal hormonların üzerinde inhibitör etkisi yaptığını göstermiştir. Testislerin önemli bir hormonu olan testosteron, erkeklerde LH sekresyonunun primer inhibitörüdür. Testosteron periferik dokularda güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona ya da östrojen bileşiği olan östradiol'e metabolize olabilmektedir. Bu androjenler ve östrojenler birbirinden bağımsız olarak LH salgılanmasını düzenlerler. Sertoli

hücrelerinden salgılanan inhibin'in FSH'ın geri dönüş mekanizmasında önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. Spermatogenetik aktivitenin düşmesi, inhibin konsantrasyonunun azalmasına neden olurken, FSH düzeyinde artışa neden olabilmektedir (Şekil 1). Diğer bir hormon prolaktindir. Hiperprolaktinemili ve testosteron yetersizliği olan erkeklerde, serum LH düzeylerinin tutarsız biçimde düşük oluşu bu hastalarda hipotalamo-hipofizer eksenin düşük testosteron düzeylerine yanıt veremediğini göstermektedir. Diğer yandan prolaktin, GnRH üretimini inhibe etmektedir ve prolaktin salgılayan tümürlü hastalarda GnRH infüzyonunun LH'yı yükselttiği gözlenmektedir. Ayrıca yüksek prolaktin düzeyi androjen salgılamasını inhibe ettiği gibi merkezi sinir sistemini de doğrudan etkileyebilmektedir. Androjen verilen ve yüksek prolaktin düzeyi bulunan bireylerde, prolaktin seviyeleri yüksek olduğu sürece libido ve cinsel fonksiyonun normale dönmediği gösterilmiştir (23).



Şekil 1. Hipotalamo - Hipofizer - Gonadal Eksen

2.3.2. Testisler

Skrotum denen ve bir septa ile bölünmüş torba içinde yerleşik, iki adet, uzun aksı yaklaşık 5 cm, ağırlığı 30-40 gram, spermatogenez ve hormonal aktiviteye sahip olan yapılardır. Skrotum, testisleri taşımanın yanı sıra kasılıp - gevşeyerek testislerin belli bir ısıda kalmasını sağlamaktadır. Testisler çift katlı zarla çevrili olup, testisi ilk saran tunica albuginea

elastik olmayan bir dokudur. Bunun iç kısmı damar ve sinir bakımından zengindir. Testisler 250 - 300 lob taşır ve her bir lobda 1-4 adet kıvrımlı seminifer tübül bulunmaktadır. Seminifer tübüller, kıvrımlı borucuklar olup duvarlarında spermatogonium ve sertoli hücrelerini taşır. Spermatogonium hücreleri spermli oluşturur, sertoli hücreleri ise spermatogenezin yolunda gitmesini sağlayan inhibin hormonunu salgırlar (22).

2.3.2.1. Leydig Hücreleri

Testisin intersitisyel doku denilen ve toplam testis hacminin yaklaşık %5 – 12' lik kısmını oluşturan bölgede yerleşik hücrelerdir. Genç bir erkekte yaklaşık 700 milyon Leydig hücresi bulunmaktadır. Leydig hücreleri, LH ve testis içindeki parakrin faktörlerin etkisiyle prekürsör hücrelerden farklılaşan hücrelerdir. Leydig hücreleri içinde vücutta bulunan testosteronun büyük bir kısmı kolesterolden sentez edilir. Oluşan testosteron endoplazmik retikulumdan sitoplazmaya, buradan da hücre dışına taşınarak kanda testosteron bağlayıcı proteine bağlanır. Testosteronun hücre dışına taşınması ve burada tutulması Leydig hücresi dışında bulunan albumin, Androjen Bağlayıcı Protein (ABP) ve testosteron-östradiol bağlayan proteinler sayesinde gerçekleştirilmektedir. Leydig hücrelerinde testosteron yapımı primer olarak LH'ya bağımlı gerçekleşir. LH dışında FSH, prolaktin, LH-RH, aktivin, inhibin, Epidermal Growth Factor (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü - 1 (IGF-1), transforming growth factor b, prostaglandinler ve adrenerjikler gibi farklı otokrin ve parakrin faktörler de Leydig hücrelerinde LH'a bağımlı steroid sentezinin gerçekleşmesinde rol oynarlar. Bununla beraber, östrojen ve androjenlerin Leydig hücrelerindeki steroid sentezini engelleyici rolleri de bulunmaktadır (22,24,25). Ritmik LH salınımına cevaben belli aralıklarla salgılanan testosteronun günlük sekresyon düzeyi sabah erken saatlerinde doruk noktada, akşam saatlerinde ise en düşük seviyelerdedir. Bazı mekanizmalar Leydig hücrelerinin LH'a cevaben üretilen testosteron üretim yeteneğini bozmakta ve testosteron üretimi için intratestiküler bir kontrol sistemi oluşturmaktadırlar. Sağlam testislerde eksojen LH uygulamasından sonra LH reseptörleri azalmaktadır. Yüksek dozlardaki GnRH ve analogları LH reseptörlerinin sayısını azaltır ve LH salgılanmasını inhibe etmektedir. Ayrıca östrojen, testosteron sentez yollarındaki enzimleri inhibe ederek testosteron üretimini doğrudan etkilemektedir. Hayvan modellerinde yapılan çalışmalarda prolaktinin LH reseptör sayısını arttırdığı gözlenmektedir (23). Normal erkeklerde testosteronun %2'si serbest (bağlanmamış) halde, %44'ü Testosteron-Östradiol Bağlayıcı Globulin (TeBG) halinde ve %54'ü albümin veya başka proteinlere bağılı olarak, seminifer tübüllerde ise androjen bağlayıcı proteine (ABP) bağılı olarak bulunur.

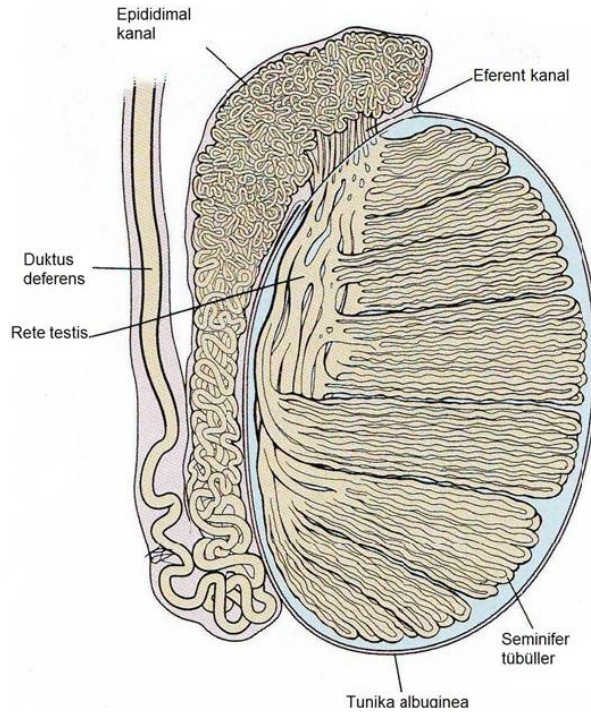
Androjenlerin biyolojik etkileri, hücre sitozolünde spesifik androjen reseptör proteini içeren hedef organlarda gözlenir. Testosteron dolaşımı terk ettikten sonra organizmadaki hedef hücelere girmektedir. Bu hücelerde 5- α redüktaz tarafından daha güçlü bir androjen olan dihidrotestosterona (DHT) dönüşebilir.

Androjenin hedef dokulardaki başlıca fonksiyonları:

- 1) Hipotalamo-hipofizer eksen tarafından gonadotropin salgılanmasının düzenlenmesi,
- 2) Spermatogenezin başlatılması ve sürdürülmesi,
- 3) Fötusun gelişmesi sırasında internal ve eksternal erkek genital sistemin farklılaşması ve
- 4) Pubertede cinsel gelişmenin endüksiyonudur (23).

2.3.2.2. Seminifer Tübüller

Olgunlaşmanın farklı evrelerinde germ ve sertoli hücrelerini içeren seminifer tübüller, testis hacminin % 85 – 90' ını oluştururlar (22,23,25) (Şekil 2). Testis dokusu, içinde kan damarları, sinir lifleri ve kas hücreleri içeren bir kapsül tarafından çevrelenmiş bir yapının içindedir. Spermatogenez, testiste seminifer tübüllerin içinde gerçekleşir. Her bir testis içinde yaklaşık 500 seminifer tübül bulunur ve tek bir tübülün uzunluğu 30–70 santimetredir. Seminifer tübüller testis hacminin yaklaşık %80-90'ını oluştururlar. Bu nedenle testis hacmi kabaca sperm üretim potansiyeli hakkında fikir verir (26-28).



Şekil 2. İnsan testisinde seminifer tübüller, epididimler ve duktus deferens.

2.3.2.3. Sertoli Hücreleri

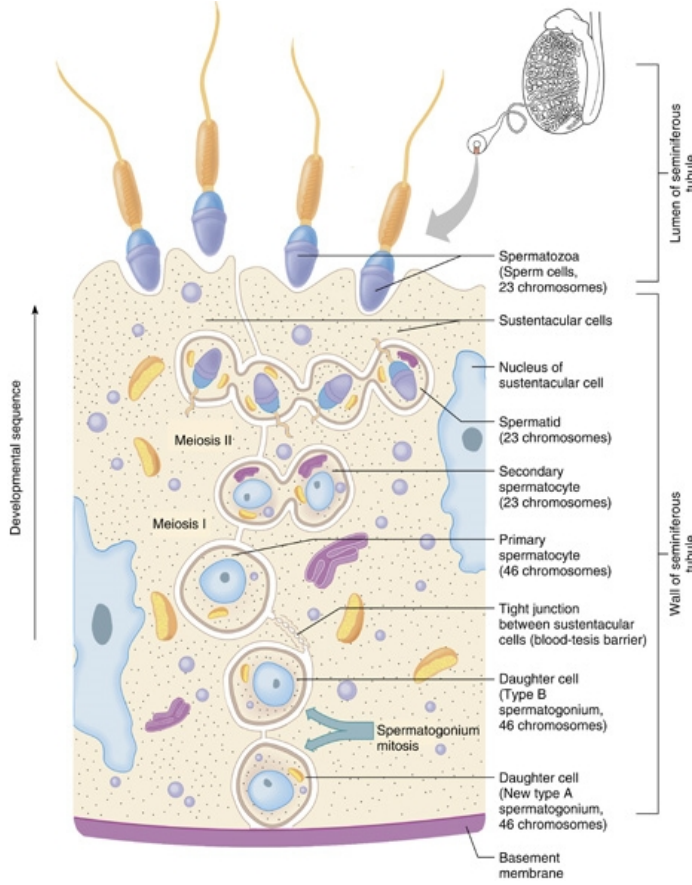
Seminifer tübüllerin bazal membranları üzerinde bulunan, lümenine doğru ipliksi sitoplazmik uzantılar veren, bölünemeyen ve sayıları sabit kalan destek hücreleridir. Bu hücreler birbirlerine, bazal ve lümenine bitişik bir kompartman olmak üzere ikiye bölen sıkı bileşiklerle bağlanırlar. Ayrıca peritübüler kontraktil hücre tabakasının yakın ilişkide olduğu miyoid hücreleri ile birlikte kan-testis bariyerinin oluşturulmasına hizmet ederek spermatogenezi kolaylaştırırlar. Bundan başka gelişmekte olan germ hücrelerini beslerler ve fonksiyonunu kaybetmiş hücrelerin fagositozunu sağlarlar (22,23).

2.3.2.4. Germinal Hücreler

Spermatogenik hücreler; bazal membran üzerine yerleşmiş ve lümenine doğru farklılaşan şekilde düzenli sıralanmış olan hücrelerdir. İnsanda gelişme sürecinin farklı evrelerini temsil ettiği düşünülen 13 farklı germ hücresi tanımlanmıştır: koyu tip A spermatogonialar (Ad); soluk tip A spermatogonialar (Ap); tip B spermatogonia (B); preleptoten primer spermatositler (R); leptoten primer spermatositler (L); zigoten primer spermatositler (Z); pakiten primer spermatositler (P); sekonder spermatositler (I) ve Sa, Sb, Sc, Sd1 ve Sd2 spermatidler (23).

2.4. Spermatogenez

Sperm üretimi oldukça uzun ve karmaşık bir süreçtir. Yaklaşık 72 günlük sikluslar halindeki insan spermatogenezi pubertede başlar, yaşam boyunca sürer. Germ hücrelerinin çeşitli aşamalardan geçtikten sonra sperm hücresi haline gelmesi "spermatogenez" olarak adlandırılır. Bu süreç içinde germ hücreleri mayoz bölünme sonrası 46 kromozumlu diploid halden 23 kromozumlu haploid hale gelirler ve yine 23 kromozom içeren haploid yumurta hücresi ile birleşerek 46 kromozumlu yeni bir bireyin oluşmasına olanak sağlarlar. Spermatogenez proliferasyon fazı, redüksiyon-bölünme fazı ve farklılaşma fazı olmak üzere üç aşamada incelenir (23,27,28) (Şekil 3). Her aşamada hücreler spermatogonia, spermatosit, spermatid gibi farklı isimler alırlar.



Şekil 3. Spermatogenez

Seminifer epitel farklı tip hücre grupları içermektedir. Germ hücreleri sperm yapımından sorumluyken sertoli hücreleri germ hücrelerinin etrafında destek dokusunu oluştururlar. Testislerde bulunan bir diğer hücre türü de erkek seks hormonu olan testosteron yapımını sağlayan Leydig hücreleridir. Seminifer tübül içinde spermatogenezin tüm aşamalarındaki sperm öncülü hücreler bulunur. Farklılaşma fazını tamamlayan hücreler seminifer tübül içine salınırlar. Bu nedenle testisin farklı kesimlerindeki alanlarda gelişimin değişik evrelerindeki sperm üretimi devam eder (27,28).

2.4.1. Spermatogenezin Genetik Özellikleri

Fötal dönemde gonadal dokuların farklılaşması ve çoğalmaları tamamen Y kromozomu tarafından organize edilir. Y kromozomunda SRY geni bulunur. Bu gen TDF (testis determining factor) olarak adlandırılan özel bir plazma proteini sentezine sebep olur. Testislerin morfogenezini TDF tarafından sağlanır. TDF proteininde oluşacak genetik defektler fenotipte ve fertilizasyonda değişik tablolarla kendini belli eder. Y kromozomunun uzun kolu (Yq) üzerinde spermatogenezden sorumlu 3 adet bölge vardır: Azoospermia Factor (AZF)

olarak adlandırılan AZFa, AZFb ve AZFc (DAZ) bölgeleri. Bu bölgelerde spermatogenezi sağlayan çok sayıda gen yer alır. AZFa bölgesindeki genlerin kaybının Sertoli cell only sendromundan, AZFb matürasyon arrestinden, AZFc ise değişik derecede oligo-azoospermiden sorumludur. Her ne kadar, genotip/fenotip arasında kesin bir ilişki kurulamamış olsa da, çoğu çalışmalar bu görüşü desteklemektedir. Leydig hücrelerinde testosteronun sentezlenmesi LH'nin stimülasyonu ile olur ve kolesterolü substrat olarak kullanır. Bu mekanizma içinde çeşitli enzimler yer alır. Enzimlerde bir defekt olduysa yetersiz virilizasyon ya da sadece infertilite ile sonuçlanabilir. Bunlarda ileri derecede oligozoospermi ya da azoospermi görülebilir. Testosteronun DHT'a çeviren 5 α redüktaz enzim defekti ve testosteron ya da DHT'u sitoplazmaya taşıyan veya ilgili sitoplazma/nükleus reseptörlerine bağlayan enzimler ve bu reseptörlerdeki defektler de neticede değişik klinik tablolar şeklinde virilizasyon bozukluğuna neden olabilir. Bunlarda sadece infertilite görülebilir. İdiopatik infertilite olgularının yaklaşık %40'ının androjen yetersizliği sonucu oluşan azoospermi ya da oligozoospermiye bağlı olduğu gösterilmiştir (22).

2.4.2. Endokrin Faktörler

Hipofizden salgılanan gonadotropinler olan FSH ve LH spermatogenezin esas düzenleyicileridir (29-33). LH, Leydig hücrelerini testosteron sentezlemesi için uyarır (29,30,32,34). Testosteronun, testiste dolaşımdakinin en az 200 katı kadar bulunması, spermatogonik hücrelerin çoğalması ve farklılaşması için gereklidir (34). FSH ve testosteron normal spermatogenez için yaşamsal önem taşır (30,32). Germ hücreleri FSH ve testosteron reseptörleri içermediklerinden, bunların esas etki alanı Sertoli hücreleridir (29,33,34). FSH'ın spermatogonial proliferasyonu uyarıcı etkisi sayesinde, Sertoli hücreleri spermatogenezde primer düzenleyici olarak rol oynarlar (30,34). Testosteron, sertoli hücrelerinin spermatidlere yapışmasını, dolayısıyla spermiogenezi indükler, ayrıca peritübüler hücreleri de etkiler (29,30,32). Hem FSH hem de testosteronun, germ hücre apoptozisini Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak baskıladığı gösterilmiştir (30,35). Seminifer epitelin hormonal uyarıya yanıtı, lokal faktörlerin etkisiyle düzenlenir (29). Primer spermatositler ve spermatidler, hem α hem de β östrojen reseptörü içermektedirler (31,33,36). Östrojen reseptör fonksiyonu, normal spermatogenezin gerçekleşmesi için gereklidir. Tiroid hormonlarının da Sertoli hücreleri aracılığıyla indirekt olarak spermatogenezini etkilediği bilinmektedir (37). Sertoli hücreleri tarafından salgılanan inhibin B ve testiküler volüm arasında bulunan

korelasyon, inhibin B'nin spermatogenez için iyi bir endokrin belirleyici olduğunu ortaya koymuştur (38).

2.4.3. Diğer Faktörler

Endokrin kontrolün yanı sıra, birçok parakrin sinyalin germ hücresinin kaderinin belirlenmesinde önemli olduğu düşünülmektedir (33,35,37). Spermatogenezin kontrolünde, hücreler arası ilişkiler, sitokinler, büyüme faktörleri, enzimler, transport proteinleri ve adezyon molekülleri etkilidir (30,37). Kalsiyum, magnezyum, bakır ve çinkonun spermatogenez için önemli olduğu bilinmektedir. Çinko, spermium nükleusunun kromatin yoğunlaşmasında işlev görür (39). Testiküler makrofajlar, direkt ve indirekt yoldan Sertoli hücresi aktivasyonunu ve germ hücrelerinin yaşamını etkiler. Spermatogenezin hasarlandığı olgularda, testisteki makrofaj sayısının arttığı bildirilmiştir (40). Artan yaşla birlikte spermatogenezde bazı değişiklikler meydana gelir. Koyu ve açık Tip A spermatogoniumların sayısında azalma, genetik bozukluklar ve spermatidlerde görülen malformasyonların yanı sıra, yaşla birlikte Sertoli hücrelerinin sayısında da azalma görülür. Spermiositler, spermatidler ve spermiumlar spesifik antijenler salarlar, fakat sperm hücresi yapımı pubertede başladığı için bu antijenler puberteye kadar oluşmazlar. Bu nedenle immun tolerans gelişmez. Daha sonra otoantikörlerin gelişimini ise kan-testis bariyeri engeller. Spermatogenik hücreler, özellikle spermiositler toksik ajanlara karşı çok duyarlıdır. Beslenme bozuklukları, sistemik hastalıklar, yaygın ya da lokal infeksiyonlar, genetik bozukluklar, testiküler ısının yükselmesi, steroid hormonlar ve onlara benzer ilaçlar, kemoterapötik ilaçlar, antimetabolitler, kadmium tuzları, kurşun ve pestisitler gibi toksik ajanlar, mutajenler ve radyasyon spermatogenezi etkileyen faktörler arasında sayılabilir. Bu ajanlar, sperm üretimini azaltırlar, kromozomal ve morfolojik anomalilere yol açarlar (29-31,34,40-43).

2.5. İnfertil Erkeğin Değerlendirilmesi

İnfertilite, bir yıl boyunca korunmasız ve düzenli cinsel ilişkiye rağmen gebelik elde edilememesi olarak tanımlanır. Normal bir çiftin bir ay içerisinde gebe kalma şansları %20-25, altı ay içerisinde %75 ve bir yıl içerisinde ise %90' dır. Normalde gebelikler ovulasyon günü veya ovulasyondan önceki ve sonraki üçer gün içerisinde girilen cinsel ilişkiler neticesinde meydana gelir. Hem erkek hem de kadın için 24 yaşında fertilizasyon oranları en yüksektir. Fertilizasyon oranları bu yaştan sonra her iki cinste de azalmaya başlar. İnfertilite

olgularının yaklaşık 1/3'ünde erkek faktör 1/3'ünde kadın faktör tek başına sorumlu tutulurken iken yaklaşık 1/3'ünde de çiftlerin her ikisinde patolojinin var olduğu kabul edilmektedir. Dolayısıyla infertil çiftlerin yarısında en az bir erkek faktörün varlığı söz konusudur (44). İnfertil erkeğin değerlendirilmesine öykü almak ile başlanır. İlk değerlendirme fizik muayene ve başlangıç laboratuvar incelemeleri ile tamamlanır. Öykü, fizik inceleme ve laboratuvar sonuçlarına göre ayırıcı tanı için ek özel testlere yönelinmelidir. Erkeklerde infertiliteye yol açan durum ve durumları tespit etmek değerlendirmenin temel amacıdır. İnfertiliteye yol açan özel bir neden bulunursa tedavi ona yönlendirilerek sonuca gidilir. Ancak olguların çok önemli bir kısmında infertilitenin idiopatik olduğu da unutulmamalıdır. Bilinen bir etyolojik faktör saptanamıyor ise ampirik tedavi, IUI (intrauterin inseminasyon) veya IVF (invitro fertilizasyon) gibi tedavi yöntemleri önerilebilir. Alternatif olarak donör inseminasyon ve evlat edinme unutulmamalıdır. Eşlere her türlü alternatif anlatılmalı, hasta uzun süreli ve sonuçsuz tedavilerle oyalanmamalıdır (45).

İnfertil erkeğin değerlendirilmesindeki hedefler:

- 1- düzeltilebilir durumların,
- 2- başka yöntemlerle düzeltilemeyen ancak erkeğin spermini kullanarak yapılan ÜYT (üremeye yardımcı teknikler) ile tedavi edilebilecek nedenlerin,
- 3- bu tekniklerle de tedavi edilemeyen ve donör inseminasyonu ya da evlat edinmeyi gerektirecek nedenlerin,
- 4- altta yatan önemli tıbbi patolojilerin,
- 5- hastayı veya çocuğunu etkileyebilecek genetik ve/veya kromozomal bozuklukların belirlenmesine yöneliktir (22,45).

2.5.1. Anamnez

İnfertilitenin araştırılmasına genel üreme hikayesinin alınarak ve 15 gün arayla 2 semen analizi yapılarak başlanır. Üreme hikayesinde;

- cinsel ilişki sıklığı ve zamanlaması,
- infertilite süresi ve önceki fertilizasyon durumu,
- çocukluk hastalıkları,
- çocukluk ve puberte gelişimi,
- sistemik hastalıklar ve geçirdiği ameliyatlar,
- cinsel yaşam,

- cinsel yolla geçen hastalıklar,
- gonadal toksinlere maruz kalınımı sorgulanmalıdır (22,45).

Eğer erkekte temel değerlendirme sırasında üreme öyküsünde şüpheli bir durum veya semen analizinde bir bozukluk saptanırsa ileri araştırma yapılmalıdır. Açıklanamayan infertilite olgularında ya da kadının tedavi edilmesine rağmen devam eden infertilite durumunda da erkeğin ayrıntılı araştırılması gerekir. İleri araştırmada tam detaylı medikal ve üreme hikayesi alınır, fizik muayene ile birlikte 15 günden az olmayan aralıklarla en az iki semen analizi yapılır. Bunları takiben, spesifik problemleri ya da hikaye, fizik muayene veya semen analizi sırasında kaydedilen sorunları araştırmaya yönelik diğer ek testler de istenmelidir (45).

2.5.2. Fizik Muayene

İnfertil erkeğin fizik incelemesi tüm sistemleri kapsamaktadır. Hastanın vücut yapısı ve virilizasyonu incelenir. Sekonder seks karakterlerinin gelişimine bakılır, jinekomasti araştırılır. Genital muayenede peniste kurvatür varlığı ve üretral meatusun yeri incelenir. Testis boyutları ölçülür. Normal erişkin testis volümü 24 ± 4 ml'dir. Testis volümünün düşük olması seminifer tübül sayısının da az olması anlamına gelecektir. Epididim muayenesinde endürasyonlar, düzensizlikler ve kistik oluşumlar muayene ile saptanabilir. Ayakta ve uygun ısı koşullarında testiküler muayene ile varikozel varlığı ve varsa derecesi belirlenebilir. Nüks varikozel ve/veya testiküler muayene zorluğu olmayan olgular dışında varikozel tanısı için radyolojik görüntüleme gerekmez (46).

2.5.3. Semen Analizi

Hikaye ve fizik muayeneden sonra, erkeğe ait laboratuvar testleri yapılmalıdır. İnfertil erkeğin değerlendirilmesinde semen analizi çok önemli bir yer tutar. Semen analizi, hastaların steril ve fertil gruplar şeklinde kesin ayırımının yapılmasını sağlamaz. Semen parametrelerinin kalitesi azaldıkça istatistiksel olarak gebelik şansı da azalır ama sıfıra inmez. Buna rağmen doğru şekilde yapılmış bir semen analizi infertil erkeğin değerlendirilmesinde önemli bir araçtır. Yapılan semen analizi WHO kriterlerine (Tablo 1) göre normal ise tek test yeterlidir. Eğer anormal bulgular var ise 15 gün aralıklarla yapılan, iki ya da üç semen analizi yapılmalıdır (47-49).

Tablo 1. WHO 2010 seminal parametreler

PARAMETRE	REFERANS ARALIĞI
Hacim	1,5 ml (1,4–1,7)
Toplam sperm sayısı	39x10 ⁶ (33–46)
Sperm konsantrasyonu	15x10 ⁶ /ml (12–16)
Toplam motilite	% 40 (38–42)
İleri doğrusal motilite	% 32 (31–34)
Canlılık	% 58 (55–63)
Sperm morfolojisi	% 4 (3–4)

2.5.3.1. Semen Toplanması

Semen 48-72 saatlik cinsel perhiz sonrası toplanmalı, bu süre 7 günü geçmemelidir. Semen laboratuvar yanında özel olarak hazırlanmış bir odada görsel cinsel uyarı ve masturbasyon yöntemi ile toplanmalıdır. Aynı hastaya ait farklı semen örneklerinin doğru biçimde karşılaştırılmasının yapılabilmesi için, örnek toplamadan önceki cinsel perhiz süresinin sabit tutulması önem taşır. Cinsel perhiz süresince gün başına sperm sayısında %25 artış olur, sperm motilite ve morfolojisinde değişiklik olmaz. Bu süre bir haftayı geçerse motilitede azalma bildirilmiştir. Sperm örneği dışarıdan laboratuvara getirilecekse vücut ısısında ve 1 saat içinde ulaştırılmalıdır (48,49).

2.5.3.2. Semen Makroskopik Değerlendirilmesi

Semen toplandığında koagulum halindedir ve 5–25 dakika arasında PSA ve plazminojen aktivatör gibi prostat kökenli proteazlar nedeniyle likefiye olur. Koagulasyondan seminal veziküllerden salgılanan bir madde sorumludur. Konjenital bilateral vas deferens agenezisi (CBAVD) olan hastalarda seminal veziküller ya yoktur ya da hipoplaziktir. Böyle hastalarda semen koagüle olmaz, asidik ve düşük hacimlidir. Semen örneğinde likefaksiyon bozukluğu var ise bunun, likefaksiyondan sonra hipervizküz kalan semenden ayırt edilmesi

gerekir. Likefiye olmamış semen koagulum halinde kalırken, hipervizköz semenin koagulum hali azalır fakat kıvamı normalden daha koyu kalır. Likefaksiyon gelişmemiş hastaların semeninde doku plazminojen aktivatör düzeyleri normal semendekinden daha düşük bulunmuş olmakla birlikte, aynı ilişki PSA düzeyleri için geçerli değildir. Likefiye olmamış semenin erkekte fertilité üzerine etkisi açık değildir. Semende likefaksiyon yok veya hipervizkozite var ise postkoital testin yapılması önerilmektedir. Bu test sırasında servikal mukusta yeterli sayıda hareketli sperm var ise semenin kıvamının bir önemi yok demektir. Ancak servikal mukus kaliteli olmasına karşın az sayıda sperm var ise genellikle yapılacak olan artifisyel inseminasyondur. Semen veya α amilaz ilave ederek likefaksiyonu artırmak mümkündür ancak bu yaklaşımın fertilitéyi artırdığına dair bilgi yoktur (48-50).

Semen volümü WHO' ya göre 1,5 ml'nin üzerinde olmalıdır. Bunun altındaki değerlerde retrograt ejakülasyon ve distal kanal patolojileri akla gelmeli ve buna yönelik araştırmalar yapılması gerekmektedir. Seminal sıvının tam yokluğuna aspermi denilmektedir. Bu durum ya retrograt ejakülasyona ya da emisyon olmamasına bağlıdır. Emisyon olmamasının en sık nedeni spinal kord yaralanmasıdır. Diabet ve multipl skleroza bağlı olarak sıklıkla görülmektedir. Retroperitoneal cerrahi ejakülasyonu kontrol eden sempatik ganglionlara zarar vermektedir, ancak bugün sıklıkla uygulanan sinir koruyucu tekniğe bağlı olarak bu komplikasyon azalmıştır. Asperminin diğer bir nedeni de orgazm olunamaması gibi psikolojik bozukluklardır. Ancak düşük ejakülat volümünün en sık nedeni spesmenin doğru toplanamamasıdır. Bu yanlıgıyı ortadan kaldırmak için test tekrarının yapılması önemlidir. Diğer bir sık neden de parsiyel retrograt ejakülasyona bağlıdır. Bunun nedenleri ise nörolojik bozukluklar, ilaçlar, mesane boynu cerrahisi ve bazı sebebi açıklanamayan durumlardır. Seminal sıvının büyük çoğunluğunu seminal vezikül salgıları oluşturmaktadır. Parsiyel ve total ejakülatuar kanal tıkanıklıklarında düşük ejakülat volümü görülmektedir. Vazal agenezde seminal vezikül sıklıkla yok olduğu için ejakülat hacmi azdır. Seminal veziküller semende fruktozun kaynağıdır. Normal semende fruktoz konsantrasyonu 120–450 mg/dl'dir. Seminal vezikül inflamasyonlarında, androjen eksikliğinde, parsiyel veya total distal ejakülatuar kanal patolojilerinde seminal fruktoz konsantrasyonu 120 mg/dl'nin altındadır. Düşük volümlü semende fruktoz tayini mutlaka yapılmalıdır (48-50).

Semen pH'sı 7,2 veya üzerinde olmalıdır. pH, asidik prostat salgıları ve alkalen seminal vezikül salgılarının karışım oranına bağlı olarak değişebilir. Normal pH ile beraber düşük semen volümü normal olabileceği gibi tam olmayan toplama veya retrograt ejakülasyon

sonucu da olabilir. Düşük ejakülat volümü ve/veya asidik pH ejakülatuar kanal patolojilerini veya vaz deferens yokluğunu akla getirmelidir (48).

2.5.3.3. Semen Mikroskopik Değerlendirmesi

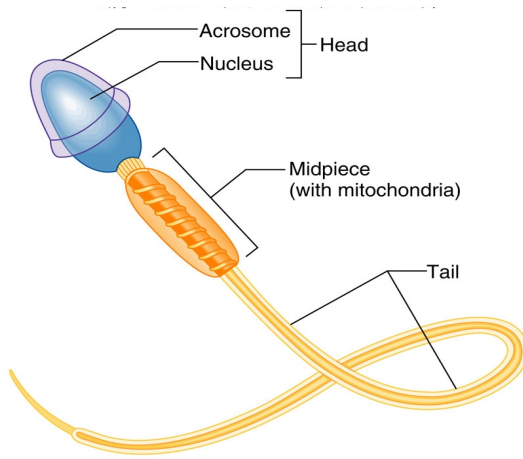
Sperm sayısı: Fertil popülasyonda bildirilen ortalama sperm sayısı mililitrede 70–100 milyondur. WHO'nun referanslarına göre olması gereken en az sperm sayısı 15 milyon/ml'dir. Bu değer altı oligospermi olarak adlandırılmaktadır. İzole oligospermi nadirdir, çoğu zaman sebebi bilinmez ve bazen androjen eksikliğine bağlı olabilir. Sayı 10 milyon/ml'den az olursa testosteron ve FSH düzeylerinin bakılması önerilmektedir. Sadece FSH yüksekliği spermatogenezdeki sıkıntıyı gösterir ve tam bir endokrinolojik değerlendirmeye gerek yoktur. Oligospermiye neden olabilecek saptanabilir en sık neden varikoseldir, bunda da seminal parametrelerde multipl defekt vardır. Ejakülatta spermatozoa hücresinin hiç görülmemesi azospermi olarak adlandırılır. Ağır oligospermiden ayırıcı tanı yapmak için azospermi tanısı iki kez olmak üzere santrifüje edilen semen örneğinin mikroskopik değerlendirilmesi neticesinde hiç spermatozoaya rastlanılmaması ile konulur. WHO insan semen analizi laboratuvarı semenin 3000 devirde veya daha fazla hızda 15 dakika santrifüje edilmesi gerektiğini önermektedir (49). Azospermi nedenleri pretestiküler, testiküler, ve posttestiküler nedenler olmak üzere üç kategoriye ayrılabilir. Azosperminin pretestiküler nedenlerinde temel sorun hipotalamik-hipofizer-gonadal aksıdır. Testiküler nedenlerde ise hipotalamus ve hipofiz fonksiyonları normal olup testislerde intrinsik olarak spermatogenezde problem vardır. Posttestiküler azospermide ise sorun; ejakülatuar disfonksiyon veya rete testis ile ejakülatuar kanal arasındaki herhangi bir seviyede obstrüksiyona bağlı sperm transportunda bozulmadır ve bu grup, azospermik hastaların yaklaşık olarak %40' ını oluşturmaktadır. Azospermik hastanın değerlendirilmesi, azosperminin spermatogenez eksikliğinden mi yoksa duktal obstrüksiyondan mı kaynaklandığını saptamaya yönelik olmalıdır. Semen 3000 devirde veya daha fazla hızda 15 dakika santrifüje edilmesini takiben pelletin 200 büyütmede tam bir mikroskopik incelemesi yapılmalıdır. Santrifüj edilmiş semen örneğinde sperm saptanmasına kriptozoospermi denir ve bilateral duktal obstrüksiyonu ekarte ettirir. Fizik muayenede testisin büyüklüğü ve kıvamı, epididimin dolgunluğu ve vazların varlığı veya yokluğu yol göstericidir. Obstrükte testisler genellikle normalden büyük, epididimler belirgin olmaktadır. Genel bir kaide olmamakla birlikte, testiküler yetmezliği olan hastalarda testisler normalden küçüktür. Hipogonadotropik

hipogonadizmlilerde virilizasyon ve sekonder seks karakterleri azalmıştır, testisler oldukça küçüktür. Serumda LH, PRL ve testosteron düzeyi mutlaka bakılmalıdır (48-50).

Sperm motilitesi: Motilite kuyruk hareketi gösteren sperm yüzdesidir. Motilitenin değerlendirilmesi likefaksiyondan sonra 1 saat içinde yapılmalıdır. Bu süre içerisinde semen oda sıcaklığında saklanmalıdır. Spermin ileri hareketinin kalitesi değerlendirilerek kaydedilmelidir. Sık kullanılan bir metoda göre sperm hareketleri 5 skalaya ayrılır. 0 hiç motilitenin olmadığını gösterir; 1 ileri progresyon göstermeyen, tembel hareketi; 2 yavaş, doğrusal olmayan, dolambaçlı ileri hareketi; 3 oldukça doğrusal ama orta hızda hareket eden sperm; 4 ise doğrusal ve hızlı hareketi belirtir (48). Spermde en fazla görülen hareket kategorisi değerlendirmeye alınır. Alternatif bir sistem sperm 4 kategoride ele alır: A ileri hızlı hareketi; B yavaş ya da tembel ileri hareketi; C ileri olmayan hareketi ve D hareketin bulunmadığını belirtir. Bu sistemde, her bir kategoriye giren sperm yüzdesi değerlendirmeye alınır. WHO 'a+b' motilitenin %40' nı, sadece 'a' kalite motilitenin ise %32' nin üzerinde olması gerektiğini belirtmiştir (49). Sperm hareket bozukluğu (astenospermi) motilitede ya da ileri harekette veya her ikisinde birden azalmayı ifade eder. Bu olgularda spermatozoanın yapısal defektlerinden, uzamış cinsel perhiz süresi, genital sistem enfeksiyonları, antisperm antikorlar, parsiyel duktal obstrüksiyon, varikozel ve idiyomatik faktörler sorumlu olabilir. Astenospermi bulgusu ya da şiddetli sperm aglütinasyonu immunolojik infertilite olasılığını akla getirir. Bu durumda antisperm antikor testi yapılmalıdır. Semen analizinde lökosit sayısı artmışsa enfeksiyondan şüphe edilmelidir ve bu durumda gerekli ileri tetkikler yapılmalıdır. Varikozel, infertil erkeklerde cerrahi olarak düzeltilebilen en sık anomali olup, sperm sayı ve şekil bozukluklarının yanı sıra sperm motilite bozukluğundan da sorumlu olabilir. Astenospermik hastalarda, özellikle ejakülat volümü düşük ve sperm canlılığı azalmış olgularda, parsiyel ejakulatör kanal tıkanıklığı düşünülebilir. Bu hastalarda TRUS yapılabilir. Sperm motilitesinin hiç bulunmadığı ya da motilitenin %5' in altında olduğu olgular sperm canlılık testleri ile değerlendirilmelidir. Motilitenin hiç olmadığı ya da azaldığı durumlarda yüksek fraksiyonda canlı sperm bulunması, immotil silia sendromu ve Kartagener sendromunda olduğu gibi ultrastrüktürel bir anomaliye işaret eder. Spermatozoanın elektronmikroskopik tetkiki böyle olguları ayırt eder. Bazen cinsel perhiz süresinin fazla uzaması da motilitede ciddi azalmayla sonuçlanabilir. Son olarak, sperm toplama kaplarındaki toksik kalıntılar ya da sıcak veya soğuk ortam azalmış motiliteden sorumlu olabilir (48).

Yuvarlak hücre sayısı: Yuvarlak hücreler immatür spermatozoalar, genitoüriner sistem epitel hücreleri, prostatik hücreler ve lökositlerden oluşur. Normalde yuvarlak hücre sayısı < 5 milyon/ml olmalıdır. Yuvarlak hücrelerden klinik olarak önemli olan lökositlerdir. Yuvarlak hücre sayısı >1 milyon/ml. olduğunda lökosit sayısını değerlendirmek için myeloperoksidaz testi (Endtz testi) yapılmalıdır. Normalde lökosit sayısı <1 milyon/ml olmalıdır (48). Artmış yuvarlak hücre sayısı olanların ancak $1/3$ 'ünde gerçekten pyospermi vardır ve semende bakteri bulunan olgularda her zaman pyospermi saptanmamaktadır. Bu nedenle pyospermili birçok hastada genital trakt enfeksiyonu yoktur. Semende lökosit enfeksiyon haricinde, anormal spermatogenez, çevresel faktörler, seks alışkanlıkları ve cinsel perhiz süresi ile ilgili olabilir (48).

Sperm morfolojisi: değerlendirme, taze semende elektron mikroskop veya faz kontrast mikroskop ile spermleri çeşitli yöntemlerle boyayarak yapılabilir (Şekil 4).



Şekil 4. Sperm morfolojik özellikleri

Doğru bir morfolojik değerlendirme için sperm boyanması gereklidir. Bunun için en fazla kullanılan boyama yöntemleri “Papanicolau” yöntemi ve “Diff- Quick” yöntemidir. Değerlendirmede birçok kriter kullanılmasına karşın en fazla kullanılanlar WHO kriterleri ve Kruger’in kesin kriterleridir (48,51,52). Bir sperm normal kabul edilebilmesi için baş, boyun, orta kısım ve kuyruğun normal olması gereklidir. Normal sperm başı, oval, boyu $5-6\mu$, eni $2,5-3,5\mu$, baş kısım boyunun genişliğine oranı $1,5-1,75$ olmalıdır. Baş bölgesinin $\%40-70$ 'ini kapsayan akrozomal bölge olmalıdır. Orta kısım ince uzun ve genişliği $<1\mu$, boyu başın $1,5$ katı ve başa aksiyel olarak bağlanmış olmalıdır. Sitoplazmik artıklar normal baş alanının yarısından az olmalıdır. Kuyruk düz, orta kısımdan ince ve yaklaşık 45μ

uzunluğunda olmalıdır. WHO kriterlerine göre ara formlar normal, Kruger'in kesin kriterlerine göre anormal kabul edilir (49,52) (Tablo 2).

Tablo 2. Kruger kesin kriterlerine göre sperm morfolojisi

Baş	Uzunluk: 5–6 μ Genişlik: 2,5–3,5 μ
Akrozom	Başın % 40-70'ini oluşturmali
Orta parça	Genişlik 1 μ Uzunluk 1,5 x baş uzunluğu
Kuyruk	Boyuna yaklaşık 45 μ Uniform Orta parçadan daha ince Kıvrılmamış Kırık içermeyen
Sitoplazmik artık	Baş alanının % 30-70'inden az Sadece orta parçada lokalize

Spermde yaygın görülen defektler:

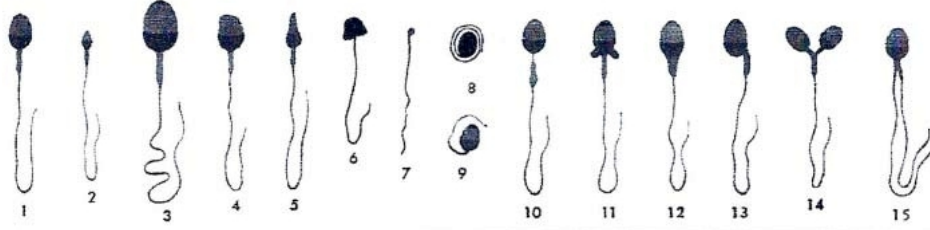
Baş defektleri: Büyük, küçük, yassı filiform, yuvarlak, amorf, vakuollü, küçük akrozomlu, çift baş ve bunların kombinasyonları.

Boyun ve orta kısım defektleri: Bükük boyun, başa düzensiz bağlanma, kalın boyun, ince boyun ve bunların kombinasyonları.

Kuyruk defektleri: Kısa, birden fazla, ince, kırık, kıvrık, düzensiz genişlikte ve bunların kombinasyonları şeklindedir.

Spermde normal morfolojiye sahip sperm oranı WHO'ya göre $> \%4$, Kruger' in kesin kriterlerine göre $\geq \%14$ olmalıdır (49,52). Kruger'in kesin kriterleri kullanılarak yapılan çalışmada, sperm konsantrasyonu 15 milyon/ml. üzerinde ve hareket $\% 30$ 'un üzerinde olan popülasyonda, normal morfolojili sperm oranı $\% 14$ 'ün üzerinde olanlarda IVF'de $\% 91$, $\% 14$ 'ün altında olanlarda ise $\% 37$ oranında fertilizasyon saptanmıştır. Bir başka çalışmada ise $\% 4$ 'ün altında $\% 7,6$ $\% 4-14$ arasında $\% 63$ fertilizasyon oranları bildirilmiştir (52). Rutin

semen analizlerinde genelde bakılmayan fakat klinik olarak kullanılabilen çoğul sperm defekti indeksleri de vardır. Teratospermik indeks (multipl anomali indeksi) (TZI) defekt sayısının, defektli sperm sayısına bölünmesi ile elde edilir. $TZI > 1,6$ ise gebelik şansı düşüktür. Defekt sayısının toplam sperm sayısına bölünmesi ile de sperm deformite indeksi (SDI) hesaplanır. $SDI > 1.6$ ise fertilizasyon oranı düşmektedir (51). Özellikle amorf ve baş anomali taşıyan spermelerin yapısal kromozom anomali sıklığı da artmaktadır. Böyle olgularda sperme ait kromozom anomalilerinin fertilizasyon bozukluğundan sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Normal sperm değerleri, gebeliği sağlamak için gerekli olan minimum değerler değildir. Bu değerlerin dışında da olursa erkek fertil olabilir. Aksine sperm parametreleri normal sınırlar içinde bulunan erkeklerde infertil olabilirler (22).



Şekil 5. Normal (no:1) ve defektli sperm formları (no:2-15)

2.5.4. Endokrin İnceleme

Erkeklerde istenecek temel hormonlar serum FSH, testosteron ve östradiol'dür (53). Testosteron düşük bulunursa total ve serbest testosteron ölçümlerinin tekrarı yanı sıra LH ve prolaktine de bakılmalıdır. Spermatogenezi bozuk olan erkeklerin çoğunda serum FSH değerleri normal bulunmakla birlikte, FSH aşırı yükselmiş ise büyük olasılıkla spermatogenez bozukluğuna işaret eder. Her ne kadar serum gonadotropin düzeyleri pulsatil salınımlarından dolayı değişkenlik göstermekteyse de, olgunun endokrinolojik yönden klinik durumunu aydınlatmada sabah tek ölçümleri yeterli olabilir. Testosteron, FSH, LH ve prolaktin arasındaki ilişki klinik durum hakkında bilgi verir (21). Özellikle sperm sayısının düştüğü (<10 milyon/ml) veya morfoloji bozukluğu görülen sperm analizi bozukluklarında, cinsel fonksiyon bozukluğu olan ya da spesifik bir endokrinopatiye işaret eden hastalığın varlığı durumlarında hormonal inceleme gereklidir. Sperm analizi normal olan erkeklerde endokrinolojik bir bozukluk çok nadir görülür. Bazı araştırmacılar infertil erkeklerin tetkikinde endokrin değerlendirmenin rutin olarak yapılmasını önermekte iselerde bu konuda fikir birliği yoktur (21,53).

2.5.5. Ejakülasyon Sonrası İdrarda Sperm Aranması

Bilateral vaz deferens agenezisi ya da klinik olarak hipogonadizm belirtileri bulunmayan erkeklerde, ejakülat volümü <1 ml. ise ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranmalıdır. Azoospermik veya aspermik bir hastada ejakülasyon sonrası idrarda sperme rastlanması, retrograt ejakülasyona işaret eder. Ejakülat volümünde düşüklük ya da aspermiye, retrograt ejakülasyon dışında emisyon yokluğu, ejakülatuar kanal tıkanıklığı, hipogonadizm ve bilateral vaz deferens agenezi olgularında da rastlanır. Ejakülasyon sonrası idrarda sperm aranması için, idrar örneği santrifüj edilerek, pellet mikroskop altında incelenir. İnceleme sonucunda en az bir sperm görülmesi retrograt ejakülasyona işaret eder (21).

2.5.6. Radyolojik Değerlendirme

Radyolojik değerlendirmenin amacı parsiyel veya total duktal obstrüksiyonun olup olmadığı, özellikli olgularda varikoselin tespiti ve gerekli hallerde testis volümünü saptamaktır. Ancak parsiyel duktal obstrüksiyonu infertilitenin diğer nedenlerinden, özellikle sebebi bilinmeyen oligospermiden ayırt etmek çok zordur.

Vazografi: Testis biopsisi ile spermatogenezi ispatlanmış azoospermik olgularda obstrüksiyonun yerini saptamak için kullanılmaktadır.

Transrektal Ultrasonografi: Vaz deferensleri palpe edilen ve ejakülat volümü azalmış azoospermik erkeklerde ejakülatör kanal tıkanıklığını araştırmak amacıyla TRUS uygulanır. Normalde seminal veziküllerin ön-arka çapı <1,5 cm.'dir. TRUS sırasında seminal veziküllerde, ejakülatör kanallarda dilatasyon ve/veya prostat içinde orta hat kisti saptanması parsiyel ya da komplet ejakülatör kanal tıkanıklığı için kesin olmasa da, olası bir tanı koydurur (54). Total ejakülatör kanal tıkanıklığı olan erkekler düşük hacimli, fruktoz negatif, asit pH'lı, azoospermik ejakülat çıkarırlar. CBAVD'li olgular da sıklıkla seminal vezikül agenezisine ya da atrofisine sahip olduklarından, aynı bulguları gösterebilir. Düşük ejakülat hacimli, oligospermik erkeklerde ve spermin ileri motilitesi bozulmuş bazı erkelerde parsiyel ejakülatör kanal darlığı bulunabilir. Bu nedenle, düşük ejakülat hacimli, vaz deferensleri palpe edilebilen ve normal testis volümü bulunan oligospermik erkeklerde de parsiyel ejakülatör kanal darlığı düşünülerek TRUS istenebilir (21).

Skrotal Ultrasonografi: Varikosel, spermatosel, vaz deferens yokluğu, epididimlerde sertlik ve testiküler kitle gibi skrotal patolojilerin çoğu fizik muayene sırasında anlaşılabilir. Testislerin yukarı pozisyonda lokalize olduğu ya da küçük skrotumu bulunan ve fizik

muayene bulgularının şüphede bıraktığı durumlar ile, skrotum ve spermatik kordonun muayenesini engelleyen hidrosel ya da diğer anatomik anormallik durumlarında da skrotal ultrasonografi yapılması gerekir. Skrotal ultrasonografi testiste kitle bulunan olgularda da endikedir. Her ne kadar muayene ile saptanamayan varikoseller skrotal renkli Doppler ultrasonografi ile tanınabilirse de bunların klinik önemi tartışmalıdır (21,54).

2.5.7. Sperm ve Semene Ait Spesifik Testler

Erkek infertilitesinin standart araştırmasında sperme ait spesifik testlerin yapılması gerekmez. Ancak sperm analizi de her zaman erkeğin fertilitate potansiyelini tam olarak yansıtmayabilir. Açıklanamayan infertilite olgularında erkek faktörünün de eşlik edip etmediğini ortaya koymak için, ya da ÜYT ile tedavi seçimi yapılmasında sperm ve semene ait spesifik testler yararlı olabilir. Bu testler arasında; antisperm antikor tayini, sperm vitalite testleri, sperm-servikal mukus etkileşim testleri, sperm penetrasyon testi, akrozom reaksiyonu, hemizona testi, sperm kreatin kinaz ölçümü, ROS tayini, sperm yüzeyinde mannoz reseptör tayini gibi nadiren gereken testler bulunur. Eğer tedavinin yönlendirilmesinde faydalı olacaksa bu testlerin yapılması önerilir (21).

2.5.8. Genetik Araştırma

Erkek infertilitesi ile ilişkili olarak üç genetik faktör bilinmektedir.

1. Konjenital vaz agenezi nedeni olan kistik fibrozis gen mutasyonları
2. Testis fonksiyonlarını bozan kromozom anomalileri
3. İzole spermatogenez defekti yapabilen Y kromozom mikrolelesyonları (22,55).

Azoospermik erkeklerin %10-15'inde, oligozoospermik erkeklerin %5'inde, normal erkeklerin ise % 1'inden azında karyotip anomalisi bulunur. İnfertilite nedeni ile tetkik edilen erkekler arasında en sık rastlanılan karyotip anomalisi Klinefelter sendromudur. Y kromozom mikrolelesyonuna azoospermik veya şiddetli oligozoospermik erkeklerin %10-15'inde rastlanır. TESE yapılacak olgularda daha önceden Y kromozomundaki delesyona uğramış bölgenin tespit edilmesinin, TESE sırasında hücre bulma şansını tahmin etmede prognostik öneme sahip olduğu ortaya konmuştur. AZFc bölgesini de içine alan kombine delesyonlarda (AZFb+c, AZFa+b+c) testiküler spermatozoaların total yokluğu söz konusudur. AZFb delesyonlarının prognozu ise oldukça kötüdür. AZFb bölgesinin total yokluğunda, TESE ile

hücre elde etme oranı sifıra yakındır. Tek başına AZFc delesyonlarında ise %50 olguda matür spermatozoa bulunmaktadır. Bu nedenle, nonobstrüktif azospermisi ya da şiddetli oligozoospermisi bulunan erkeklerin, kromozom anomalisi veya Y kromozomu mikrodelesyonu taşıyabilecekleri konusunda bilgilendirilmeleri gerekir. Böyle erkeklerden spermleri ICSI'de kullanılmadan önce karyotip analizi ve Y kromozom mikrodelesyonu testleri istenmelidir. Erkek ya da kadında genetik bir bozukluktan şüphelenilirse, genetik danışma verilmelidir. Görüldüğü gibi, erkek infertilitesi, etyolojisinde genetik faktörlerin de yer aldığı kompleks bir hastalıktır. Erkek infertilitesi olgularının büyük oranda idiopatik olarak adlandırılması, spermatogenez ve sperm fonksiyonlarının temel mekanizmalarının tam olarak anlaşılabilmesi ve etyolojinin bu nedenle karanlık kalması sebebiyledir. Genetik infertilite olgularında spermatogenik bozukluğun altında yatan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Yapılacak geniş tabanlı assosiasyon çalışmaları, testiküler ve spermatozoal ekspresyon çalışmaları, spermatogenezin moleküler mekanizmalarını aydınlatacak, gelecekte bu konudaki tanı ve tedavinin doğru yönlendirilmesini sağlayacaktır (55-59).

2.6. İnfertilite Tedavisi

İnfertil erkeklerin tedavisinde farmakolojik yaklaşımlarla spermatogenez kalitesinin iyileştirilmesi amaçlanırken, cerrahi olarak ürolojik sorunlar ortadan kaldırılır. Hastaların büyük kısmında başlangıçta spesifik bozukluklar düzeltilerek ya da ampirik yöntemler kullanılarak semen kalitesinin iyileştirilmesi düşüncesiyle tedaviye başlanılmaktadır. Ancak, farmakolojik bir tedavi planlanıyorsa bunun en az bir spermatogenez siklusu içine alacak şekilde 3 ay veya daha fazla süreyle kullanılması gerektiği unutulmamalıdır (60).

2.6.1. Erkek İnfertilitesinde Medikal Tedavi

Erkek infertilitesinde medikal tedavi nedene yönelik (spesifik) ve ampirik olarak uygulanabilir (61-64).

2.6.1.1. Spesifik Tedavi

Endokrin bozukluklar, lökospermi, immunolojik infertilite, gonadotoksinlere maruziyet gibi durumlarda, bozukluğa yönelik medikal tedaviler uygulanır (61).

Endokrin bozukluklar

a) Hipogonadotropik hipogonadizm: Gonadotropin yetmezliğinde normal spermatogenezin başlatılması dışarıdan gonadotropik hormon veya gonadotropin releasing hormon verilmesiyle mümkün olabilir. Human koryonik gonadotropin (hCG) LH aktivitesine, Human menopozal gonadotropin (hMG) ise hem FSH hem de LH aktivitesine sahiptir. Spermatogenezin başlaması ilk 3–6 ay içerisinde görülürse de, bu süre 20 ay veya daha uzun da sürebilir. Sperm sayısı genellikle 10 milyonun üzerine çıkmaz. Birçok hastada sperm sayısı az olmasına rağmen gebelik sağlanabilmektedir. Spontan gebelik sağlanamayan olgularda sperm parametreleri göz önünde bulundurularak yardımcı üreme teknikleri uygulanır (22,60). Leydig hücre yetmezliğine bağlı primer hipogonadizm nadir görülen bir infertilite nedenidir. Serum testosteronunun normal düzeylere çıkarılabilmesi için testosteron replasmanı yapılır. Libido ve seksüel fonksiyonlarda düzelme de görülebilir, ancak bu olgularda testosteron replasmanının spermatogeneze katkısı yoktur (60).

b) Hiperprolaktinemi: Hiperprolaktinemide spermatogenez inhibe olur. Posterior hipofizden aşırı prolaktin salgılanması infertilite ve seksüel fonksiyon bozukluklarına yol açabilir. Hiperprolaktinemili infertil hastalarda prolaktin inhibitörleriyle tedaviden olumlu sonuçlar alınmakta ve olgular fertil hale gelmektedir (60).

c) Konjenital adrenal hiperplaziler: Kortizol mekanizmasında enzimatik defekt sonucu böbreküstü bezlerinde üretilen aşırı miktardaki androjenler testiküler gelişimi engellemektedir. Puberte prekoks gelişir. Tanı kan ve idrar tetkikleri ile konur. Kortikosteroid tedavisi ile spermatogenez sağlanabilir (62).

d) Tiroid fonksiyon bozuklukları: Hipertiroidizm de spermatogenezis üzerine etkilidir % 0,6 oranında erkekte infertiliteye neden olabilir. Tiroksin replasman tedavisi genellikle fertilitenin tekrar kazanılması ile sonuçlanır (60-62).

Lökospermi: Erkek infertil hastaların %10-20'sinde lökospermi vardır. Genital sistem enfeksiyonuna ait semptomu olan olguların tedavi edilmesi gerekmektedir (61).

İmmunolojik infertilite: Antisperm antikorlar erkek infertilitesinin %3-7'sinde immunolojik infertilite nedeni olarak görülürler. Sperm immünizasyonu gelişen infertil erkeklerin çoğunda sperm analizi normal olmasına karşın, spontan sperm aglütinasyonu ve motilite azlığı gibi durumlarda antisperm antikorların varlığı akla gelmelidir (61). İmmunolojik infertilitenin tedavisinde en çok başvurulan yöntem düşük doz sistemik kortikosteroidlerle yapılan immünsüpresyondur. Alternatif olarak siklosporin kullanılabilir. Altı ay süreli kullanımlarında başarılı sonuçlar alınmıştır (60). Sperm yıkama yöntemleri kullanılarak sperm yüzeyinde ve seminal plazmada bulunan antisperm antikorlar uzaklaştırılabilir. Son zamanlarda IgA1 proteaz enzimi kullanılarak antisperm antikorları sperm yüzeyinden ayırmak mümkün olmuştur. Bu yöntem ve yardımcı üreme tekniklerinin birlikte kullanılması immunolojik infertilite tedavisinde ümit vermektedir (60,63).

Gonadotoksinler: Endüstriyel toksinlerin erkekte fertilitiyi azalttığı düşünülmektedir. Toksisitenin mekanizmasının germinal epitele direkt etki yoluyla olduğu gösterilmiştir. Değişik mesleklere özgü spesifik gonadotoksinler tanımlanmıştır. Bunlar değişik pestisitler, organofosfatlar, organoklorinler, karbamatlar, fumigantlar, herbisitler ve fungusitlerdir. Tedavi stratejisi bu etkenlerden uzak kalma ya da korunmadır. Erkek infertilitesinde endüstriyel ve tarımsal gonadotoksinlere maruz kalmanın en aza indirilmesiyle infertilite riski azaltılabilir (61).

2.6.1.2. Ampirik Tedavi

Belirgin patolojinin saptanmadığı oligozoospermi ve açıklanamayan infertilite varlığında, çok sık kullanılmamakla ve ayrıca sonuçları tartışmalı olmakla birlikte kullanılan çeşitli ampirik tedavi yöntemleri mevcuttur. Bu grupta hormonal ve non-hormonal tedaviler uygulanmaktadır (61).

a) Antiöstrojenler

Klomifen sitrat: Sentetik, steroid olmayan bir antiöstrojendir. Hipotalamus ve hipofizdeki östrojen reseptörlerine bağlanarak feedback inhibisyonu önler. GnRH, FSH ve LH sekresyonları yükselir. Bunların Leydig hücrelerinden testosteron salgısını artırarak ya da FSH yoluyla sertoli hücrelerini uyararak spermatogenezi düzeltmesi beklenir (65).

Tamoksifen: Klomifen sitrattan daha az etkiye sahip bir antiöstrojendir. Etki mekanizması klomifen sitrata benzer. Serumda östrojene duyarlı bağlayıcı protein konsantrasyonunda artış yapmaz. Sperm konsantrasyonunda % 0-100 arasında artış bildirilirken, gebelik sıklığı genelde % 11-40 olmaktadır. Motilite üzerine fazla bir etkisi bulunmaz (60).

b) Androjenler

Yüksek doz testosteron gonadotropin sekresyonunu baskılar, intratestiküler testosteron üretimini durdurur ve spermatogenezi bozar. Bu tedavi yaklaşık 5 ay içerisinde azoospermi geliştirebilir. Tedavinin birden bırakılmasıyla spermatogenezin 4 ay içerisinde tekrar başlaması ve sperm sayısının artması amaçlanır (65,66). Wang ve arkadaşlarının yaptığı plasebo kontrollü çalışmada semen parametrelerinde düzelme olmadığı ve gebelik oranlarının kontrol grubu ile aynı olduğu görülmüştür (67). Günümüzde testosteron rebound tedavisi erkek infertilitesinin ampirik medikal tedavi seçenekleri arasında yer almamaktadır.

c) Gonadotropinler

Hipogonadotropik hipogonadizmde hormonal tedavi ile başarılı sonuçların alınması normogonadotropik oligozoospermi olgularında gonadotropinlerin kullanımını gündeme getirmiştir. Burada amaç testislerde testosteron yapımını artırarak spermatogenezi uyarmak ya da bilinmeyen bazı mekanizmalarla germinal epitel üzerine etkide bulunulmasını sağlamaktır. Çok sayıdaki çalışmalara göre; tek başına hCG kullanılarak sperm konsantrasyonunda ortalama % 17–35, motilitesinde ise % 22–94 düzelme elde edilmektedir. Gebelik oranları ise % 6–47 arasındadır. hCG ile birlikte hMG de eklendiğinde sperm konsantrasyonundaki artış % 50'ye çıkabilmektedir. Ampirik gonadotropin tedavisi ekonomik profili ve sonuçlarının çok iyi olmaması nedeniyle ancak seçilmiş bir grup hastada kullanılabilir (60). Ciddi seminal parametre bozukluğu gösteren ya da daha önce IVF uygulamalarında başarısız kalınmış olgularda pür FSH kullanılması ile fertilizasyon oranlarında artış gözlemlenmiştir. Burada seminal parametrelerde düzelme gözlenmemekle birlikte kalitatif bir etki söz konusudur. Bu şekilde yardımcı üreme tekniklerinde başarıyı artırmak ya da spontan gebelik şansını yükseltmek amacıyla pür FSH kullanımı tavsiye edilmektedir (68).

d) Gonadotropin Releasing Hormon

Alternatif bir tedavi yöntemi sentetik GnRH analogları kullanarak hipofizer gonadotropin salınımını artırmaktır. Normalde GnRH 90 dakika aralıklarla salgılanır ve 4–9 dakika gibi kısa bir yarı ömrü vardır. Bu nedenle taşınabilir infüzyon pompası ile aralıklı hormon verilmesi normal GnRH salgılanmasını en iyi taklit eden sistem olmuştur. 90–120 dakika aralıklarla 5µg GnRH'un subkutan olarak 12–24 hafta boyunca kullanılması önerilir. Bu yöntemle alınan sonuçlar çelişkilidir. Uygun doz ve salınım sıklığı ayarlanabildiğinde yeterli cevap alınması mümkün olabilir (60).

e) Aromataz İnhibitörleri

Aromataz, testosteronun periferde östradiole çevrilmesini sağlayan bir enzimdir. Östrojenlerin spermatogenez üzerine olumsuz etkileri vardır. Östrojen seviyesinin düşürülmesi veya testosteron östrojen dengesindeki bozuklukların düzeltilmesi ile idyopatik oligozoosperminin düzelebileceği düşünülerek aromataz inhibitörleri denenmiştir. Plasebodan farklı sonuçlar alınamayan çalışmaların yanı sıra, % 33'lük gebelik oranları bildiren çalışmalar da vardır. Sperm motilitesi ve semen volümü üzerine belirgin etkisi bulunmamaktadır (60,69).

f) Diğer İlaçlar

Kallikrein: Kallikrein, kininojenin bradikinin ve kallidine dönüşümünü sağlayan polipeptid yapıda bir enzimdir. Koagülasyon ve fibrinolizis sisteminde rol oynayan bradikinin ve kallidin lokal inflamatuvar cevaptan da sorumludur. Aynı zamanda spermatogenezde rol oynayan bradikinin ve kallidin spermin servikal mukusa penetrasyon ve migrasyonunu artırır. Kininlerin ayrıca vasküler permeabiliteyi artırıcı, glukoz taşınmasını kolaylaştırıcı, düz kas kasıcı ve testislere kan akımını artırıcı özellikleri de ortaya konmuştur (70-73). Kallikrein'in esas kaynağı pankreas olmakla birlikte, kallikrein kinin sisteminin komponentleri kadın ve erkek üreme sistemi sekresyonunda da bulunmaktadır. Yan etkileri oldukça az olan kallikrein, prostat ve epididimin inflamatuvar hastalıklarında kinin serbestlenmesine bağlı alevlenmeler yapabilmektedir (72-74). İnfertilite tedavisinde kallikrein kullanımına ait farklı sonuçlar bildirilmekle birlikte, sperm parametrelerinde düzelme ve gebelik oranlarında artma olduğu görülmektedir (75).

Prostoglandin sentez inhibitörleri: Prostogalandinlerin spermatogenez, steroidogenez ve sperm motilitesi üzerine bozucu etkileri vardır. PgE ve PgF seminal veziküllerde ve seminal plazmada yüksek konsantrasyonda bulunur. Nonsteroid antiinflamatuvar ilaçların seminal prostoglandinleri düşürdükleri gösterildikten sonra indometazin ve ketoprofen oligospermik erkeklerde kullanılmaktadır (76–78). Sperm sayısını %25, sperm motilitesini %35 oranında artırdığı bildirilmektedir. İndometazin veya ketoprofen 3–6 ay süre ile kullanılır (79,80).

Pentoksifilin: Erkek infertilitesinde testis ve epididimiste mikrosirkülasyonu düzenleyici etkisinden faydalanmak amacıyla kullanılmaktadır. Ayrıca, fosfodiesteraz inhibisyonu da yaptığından hücre içi cAMP düzeyi yükselir (70,74,81). Sonuçta hücrede glikoliz ve endojen ATP yapımı artar. Bunun da sperm motilitesini artırması beklenir. Sonuçlar çelişkilidir. İn vitro kullanımda sperm yıkama solüsyonlarına pentoksifilin eklenmesi ile normozoospermik ve oligozoospermik olgularda sperm aktivasyonunda artış gözlenir. Pentoksifilinin akrozom reaksiyonunu uyardığı ve reaktif oksijen radikallerinin yapımını azalttığı ortaya konmuştur. Ancak embriyogenez üzerine zararlı etkilerinden dolayı inseminasyon öncesi spermin yıkanarak temizlenmesi gerekir (60).

Antioksidanlar: İdiopatik infertilite bulunan hastaların bir kısmında, semende reaktif oksijen radikallerinde artış gösterilmiştir. Buna paralel olarak sperm-oosit füzyonunda bozulma ortaya çıkmaktadır. Klinikte bazı ilaçların reaktif oksijen radikallerinin etkisini elimine ettiği gösterilmiş ve infertilite tedavisinde kullanılmaya başlanılmıştır. E vitamini antioksidan etkisinden faydalanılarak invitro kullanımında sperm-oosit füzyonunu düzelttiği gösterilmiştir. Ama oral kullanımında seminal plazma parametrelerinde sabit bir düzelme elde edilememiştir. Glutathione, lipid peroksidasyonunu önleyen bir antioksidandır ve özellikle astenospermide tavsiye edilmektedir (60).

2.6.2. Erkek İnfertilitesinde Cerrahi Tedavi

İnfertilitenin cerrahi tedavisi; varikosel, inmemiş testis gibi sorunların ameliyatla düzeltilmesi yanında vazo-vazostomi, vazo-epididimostomi ve ejakülatuar kanallara yapılan cerrahi girişimleri kapsar.

2.6.2.1. Varikozel Tedavisi

Erkek infertilite tedavisinde varikozektomi en çok uygulanan cerrahi metoddur (64,77,82). Varikozel ameliyatından sonra hasta başka bir tedavi yöntemi uygulanmaksızın en az 6 ay süreyle 3 ayda bir spermioqram yapılarak izlenmelidir. Spermioqramdaki düzelmeler bazen bir yıla kadar uzamaktadır. Genellikle varikozel cerrahisinden sonra ilk 12 ay içinde spermioqram parametrelerindeki düzelme oranı % 30–90, gebelik oranı % 10–55 arasında değişmektedir. Ameliyat ile gebelik oluşumu arasında geçen süre 6–12 ay olarak kabul edilmektedir (60,82). İnfertilite süresi iki yılı aşan hastalarda klinik olarak varikozel ve oligospermi varlığında varikozektomi endikasyonu vardır. Adolesan dönemindeki bireylerde klinik izlemde testiküler gelişimin bozulduğu belirlenirse varikozektomi önerilir (64,82).

2.6.2.2. Obstrüktif İnfertilite Tedavisi

İnfertilite nedeniyle polikliniğe başvuran hastaların % 3,5'i obstrüktif infertilite vakalarıdır. Bu olguların % 85'inde olay epididimdedir. Obstrüksiyon saptanan olgularda yapılacak tedavi yöntemleri vazo-vazostomi, vazoepididimostomi, veziküla seminalis kist aspirasyonu ve ejakülatör kanallara yapılan girişimler olarak sayılabilir (60).

2.6.3. Üremeye Yardımcı Teknikler

İnfertilite sebebiyle başvuran çiftlerin ilk arzusu fizyolojik yoldan çocuk sahibi olabilmektir. Erkekte tedaviyi takiben fizyolojik yoldan eşlerinde gebeliğin sağlanabileceği birçok düzeltilebilir faktör bulunmaktadır. Buna rağmen olguların önemli bir kısmında fizyolojik yollardan gebelik sağlanamamaktadır. Böyle durumlarda üremeye yardımcı tekniklerin (ÜYT) kullanılması gerekmektedir. ÜYT'in kullanılması ile infertilite olgularında sorun büyük oranda çözümlenebilmektedir. Günümüzde 3 çeşit ÜYT uygulaması yapılmaktadır. IUI, IVF ve ICSI (83).

2.6.3.1. İntrauterin İnseminasyon (IUI)

Kısaca, spermin yıkanarak iyi motilite ve morfolojideki spermatozoanın konsantre halde uterus içerisine bir kanül vasıtasıyla verilmesidir (83).

2.6.3.2. İnvitro Fertilizasyon (IVF)

Kadımdan toplanan oositlerin (OPU: oocyt pick up) bir petri kutusu içerisinde spermatozoa ile 24–48 saat inkübe edilmesi, arkasından oluşan embriyoların uterus kavitesine transferini içerir (83).

2.6.3.3. İntrasitoplazmik Sperm İnjesiyonu (ICSI)

Tek bir spermatozoanın oosit sitoplazması içerisine mikroskop altında mikroenjesiyonudur. IUI için ileri motil en az 5 milyon spermatozoa gerekmektedir, ICSI’de tek bir spermatozoa bile yeterli olur. Ancak gerek kanıta dayalı tıp gerekse maliyet açısından her infertilite olgusunda ICSI yapılması hatadır. Erkek faktör varsa veya daha önceki fertilizasyon denemeleri başarısız kalmışsa ICSI düşünölmeli, izah edilemeyen infertilite ve kadın faktörü olgularında doğrudan ICSI’ye geçilmeyip, diğere yöntemler denenmelidir (83). Aşağıdaki durumlarda ÜYT endikasyonu vardır:

- a. Ürolojik ya da medikal tedavilerin başarılı olmadığı durumlar
- b. Açıklanamayan infertilite olguları
- c. Temel sperm parametrelerinde orta ya da şiddetli bozukluk bulunması
- d. Sperm fonksiyon testlerinde patolojik sonuç alınması

ÜYT’ de kullanılmadan önce semenin hazırlanması gerekir. Bu yöntemlerin hepsinde de seminal plazma ortamdan uzaklaştırılırken, motilitesi bulunmayan sperm ve lökositler elimine edilerek motil sperm seçimi yapılır. Spermin yıkanarak hazırlanmasında sıklıkla 4 metod kullanılır:

- 1- Swim-up (yüzdürme) tekniğı
- 2- Standart yıkama yöntemi (santrifüj ve yüzdürme)
- 3- Gradient tekniğı
- 4- Mini- gradient yöntemi

Sperm yıkandıktan sonra ileri motil (a+b katogorisinde) total sperm sayısı 5 milyondan fazla ise en az 3 en çok 6 siklus IUI ile tedaviye başlanır. Ancak kadının yaşı >35 ise, IVF/ICSI tercih edilebilir. Total motil sperm sayısının 5 milyondan az ve morfolojisinde %4-14 arasında olduğı olgularda IVF önerilir. Total motil sperm sayısının < 1,5 milyon ve kesin morfolojinin < %4 olması durumunda ise ICSI uygundur. Ancak bazı otörler geniş

serilerine dayanarak, total motil sperm sayısı 1 milyonun altına inmedikçe ve normal morfoloji > % 4 kaldıkça IUI'dan vazgeçilmemesini önermektedirler (83).

2.7. Serbest Oksijen Radikalleri

Son yörüngelerinde eşleşmemiş bir elektron taşıyan atom ve moleküller “serbest radikaller” olarak tanımlanır. Ömürleri çok kısa olan ve kararsız bir yapı gösteren bu bileşikler etrafındaki moleküllerle reaksiyona girerek elektron almaya çalışır ve bir an önce kararlı hale ulaşmak ister (2,3). Bu nedenle çok reaktiftirler ve pek çok moleküle etkileşerek onları kararsız hale sokup yıkılmalarına neden olurlar (2,3). Aerobik organizmalarda serbest radikallerin çoğu oksijen ve azot kaynaklıdır. Aktif oksijen ve türleri ve azot kaynaklı radikaller fizyolojik olarak az miktarda üretildiklerinde sperm matürasyonu, kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve sperm-oosit füzyonu gibi pek çok fizyolojik olayda önemli rol oynarlar (4,5). Spermatozoalar düşük konsantrasyonda hidrojen peroksit ile birlikte inkübe edildiğinde sperm kapasitasyonu, hiperaktivasyonu, akrozom reaksiyonu ve oosit füzyonunun uyarıldığı bildirilmiştir (6). Nitrik oksit (NO) ve süperoksit anyonunun özellikle kapasitasyon ve akrozom reaksiyonu basamaklarında etkili olduğu ileri sürülmektedir. ROS, sperm-oosit etkileşiminde de rol oynamaktadır (5-7). Fizyolojik rollerinin önemine karşın, serbest radikaller aşırı miktarda üretildiklerinde hücre için yaşamsal tehdit oluşturabilmektedir. Semen matür ve immatür spermatozoaların yanı sıra, spermatogenezin farklı evrelerinden köken alan yuvarlak hücreler, lökositler ve epitel hücreleri gibi farklı tipte hücreleri de içerir. Bunlar arasında lökositler (nötrofil ve makrofajlar) ve immatür spermatozoalar ROS'un başlıca endojen kaynaklarıdır (5,6). NO ise erkek genital sistemindeki fagositler, endotel hücreleri ve düz kas hücreleri gibi kaynaklardan köken alır (8). ROS, sigara, alkol, kafein, endüstriyel bileşikler, çevre kirliliği, ağır metaller ve radyasyon gibi etkenlerle ekzojen olarak da oluşabilmektedir (9). Sigaranın seminal plazmada antioksidan kapasiteyi azalttığı, potansiyel bir ROS kaynağı olan lökosit sayısını %48 oranında arttırdığı ileri sürülmüştür (9). İdiyopatik infertilite, spinal kord yaralanmaları, varikosel ve genitoüriner enfeksiyon gibi patolojilerde de semende ROS'un arttığı bildirilmiştir (5,9-13). Lipitler, proteinler ve nükleik asitler gibi bütün hücresel komponentler ROS'un potansiyel hedefidir. Bu makromoleküller arasında özellikle lipitler oksidatif ataklara en açık olan gruptur. Memeli spermi çoklu doymamış yağ asidinden (ÇDYA) zengindir ve çift bağların mevcudiyeti bu yapıyı oksidatif hasara oldukça duyarlı kılar (5,14). Sperm membranında yer alan ÇDYA'nin yaklaşık yarısı 6 adet çift bağ içeren dekosahexanoik

asittir. Lipit membranlarındaki ÇDYA'larında başlayan peroksidasyon reaksiyonu bir zincir şeklinde ilerleyerek membran yapısını, akışkanlığını, iyon gradiyentini, reseptör transdüksiyonunu, transport ve membran enzimlerini etkileyebilir (5). Spermin motilitesi, yaşam süresi ve fonksiyonları ROS'un neden olduğu lipit peroksidasyonuna bağlı olarak bozulabilir (15). Serbest radikaller doğrudan veya dolaylı etki göstererek proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını bozarlar. Ayrıca, sperm DNA'sına etki ederek baz modifikasyonları, sarmal kırıkları ve kromatin çaprazlaşmalarına neden olarak DNA'nın bütünlüğünü bozabilirler (9). Aşırı miktarda ROS üretimi, hatalı akrozom reaksiyonuna ve spermde motilite ve fertilitate bozukluklarına yol açar (9). Sperm hücrelerinde ROS'a bağlı oluşan hasarın derecesi serbest radikal türüne, miktarına ve serbest radikallere maruz kalma süresine göre değişir. Spermatozoaların aşırı miktarda ROS ile karşılaştığında hasar oluşumunu engelleme veya oluşan hasarı onarma yeteneği son derece kısıtlıdır (9,14). Ayrıca, sitoplazmasında serbest radikalleri toplayıcı enzimlerin düşük konsantrasyonda oluşu spermatozoayı oksidatif ataklara karşı savunmasız kılar.

Seminal plazma erkek üreme yollarındaki bezlerin fizyolojik bir salgısıdır. Seminal plazmayı başlıca seminal veziküllerin, prostat ve bulbouretral bezlerin sıvıları oluşturur. Seminal plazma hormonal, enzimatik ve yüzey modifiye edici olaylar aracılığı ile spermatozoanın matürasyonunda ve taşınmasında önemli rol oynar (16). Bu kompleks karışım türler arasında olduğu gibi aynı tür içindeki erkeklerde de farklılık gösterir. Seminal plazmanın organik bileşenleri sperm metabolizmasının, pH ve osmolaritesinin sürdürülmesinde esastır ve bu bileşenler arasında proteinler memelilerde sperm fonksiyonlarına en önemli katkıyı yaparlar. Seminal plazma proteinlerinin çoğu seminal vezikülün sekretuar ürünüdür (16). Seminal plazma ROS ile indüklenmiş hasara karşı spermatozoayı koruyabilmek için güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir (4). Bu koruyucu sistem ROS'a bağlı zincirleme reaksiyonu durduran, oksidan radikalleri toplayan veya nötralize eden antioksidan moleküller içerir. Bu antioksidan moleküller epididim, seminal vezikül ve prostat tarafından lokal olarak sentezlenmektedir. Seminal plazmada bulunan başlıca antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-Px), glutatyon redüktaz (GSH-R) ve katalaz gibi enzimatik antioksidanların yanı sıra askorbik asit, taurin, hipotaurin, eser elementler ve tiyol grupları gibi enzimatik olmayan antioksidanlar da seminal plazmanın başlıca bileşenleridir (17,18).

2.8. Serbest Oksijen Radikallerinin Hücreye Zararlı Etkileri

Serbest radikaller, hücrenin lipid, protein ve DNA'sında çeşitli derecelerde hasara neden olabilmektedir. Oksijen, mitokondride, endoplazmik retikulumda, plazma membranında, peroksizomlarda ve sitozollerde oksidatif enzimler tarafından süperoksit anyonuna dönüştürülmektedir. Oluşan süperoksit anyonları, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile hidrojen perokside dönüştürülmektedir. Cu^{++}/Fe^{++} ile katalize olan Fenton reaksiyonu yoluyla hidroksil radikalleri oluşmaktadır. Burada ayrıca süperoksit anyonları, Fe^{+++} 'in Fe^{++} 'ye indirgenmesini katalize eder ve Fenton reaksiyonu sayesinde hidroksil oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar.

2.8.1. Oksidatif Stres Göstergeleri

2.8.1.1. Membranların Lipid Peroksidasyonu

Lipit peroksidasyonu, hücre membranlarının temel bileşeni olan lipitlerin serbest radikaller tarafından başlatılan enzimatik olmayan oksidasyonudur (84). Zincirleme olarak gerçekleşen ve geri dönüşümsüz olan bu reaksiyon, ÇDYA'dan bir hidrojen atomunun uzaklaşması ile başlar. Oluşan lipit radikali (L), çift bağların yeniden düzenlenmesi ile önce dien konjugatına (DK), moleküle oksijen eklenmesi ile de lipit peroksil radikaline (LOO) dönüşür (2,85). Bu lipit peroksil radikalleri membran yapısındaki diğer ÇDYA moleküllerinden hidrojen atomlarını çıkartarak yeni reaksiyonları başlatırken, kendileri de lipit hidroperoksitlerine (LOOH) dönüşür. Lipit hidroperoksitlerinin malondialdehit (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (4-HNE) gibi aldehitler ve pentan, etan gibi hidrokarbon gazlara dönüşmesi ile lipit peroksidasyon reaksiyonları sona erer (84).

Lipit peroksidasyonu, primer ya da sekonder peroksidasyon ürünlerinin ölçümü ile değerlendirilebilir. Primer ürünler, DK ve lipit hidroperoksitlerdir. Sekonder ürünler ise MDA, 4-HNE ve izoprostanlardır (84,85). Lipit peroksidasyonunda bir ara ürün olan DK sıklıkla saf lipitler, lipoproteinler ve membran lipitlerindeki peroksidasyonu göstermek için kullanılır. Lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA oksidatif stres göstergesi olarak yaygın kullanılmaktadır. MDA genellikle tiyobarbitürik asit (TBA) ile oluşturduğu renkli kompleks spektrofotometrik olarak ölçülerek saptanır (84,85). Basit, pratik ve oldukça kabul gören, bir yöntemdir. Bu yöntemde, ortamdaki bazı başka ürünler de TBA ile reaksiyona gir-

diğinden bazı araştışıcılar MDA terimi yerine tiyobarbitürük asitle reaksiyon veren maddeler (thiobarbituric acid reactive substances) anlamına gelen "TBARS" terimini kullanmaktadırlar. 4-HNE ise oldukça reaktif bir lipid peroksidasyonu ürünüdür ve proteinlerle etkileşime girerek HME-protein kompleksleri (HNE-protein adduct) oluşturur (84,86). Bu komplekslere karşı antikor üretilerek hazırlanmış olan ELISA kitleri mevcuttur. İzoprostanlar ise özellikle son yıllarda önem kazanmaya başlamış olan bir lipid peroksidasyonu göstergesidir (9,87). İzoprostanlar membrandaki fosfolipitlerin yapısındaki "araşidonik asit" in serbest radikallerle reaksiyona girmesi sonucu oluşan ürünlerdir. Fosfolipaz A2 enzimi ile membrandan kesilip serbest forma dönüştürülerek biyolojik sıvılara atılır. Bunlar arasında 8-izoprostan en çok ölçülen izoprostandır (87,88). Khosrowbeygi ve arkadaşları hücre membranlarından seminal plazmaya dökülen serbest 8-izoprostan düzeylerini ölçmüşler ve spermdeki oksidatif stresin gösterilmesinde spesifik bir belirteç olabileceğini ifade etmişlerdir (88).

2.8.1.2. Proteinlerin Oksidatif Modifikasyonu

Serbest radikaller proteinler üzerinde de doğrudan veya dolaylı olarak etki gösterebilirler. Proteinlerin oksidatif modifikasyonunun çok fazla tipi olup bunlar arasında aminoasit modifikasyonları, peptid zinciri fragmentasyonları, çapraz bağlanmalar, yük değişiklikleri ve protein yıkımına duyarlılık/direnç artışları sayılabilir (14). Biyolojik örneklerde en yaygın protein oksidasyon ürünü prolin, arginin, lizin ve treoninin protein karbonil (PK) türevleridir (12). PK türevleri kimyasal olarak stabildir ve protein oksidasyonunu gösteren erken bir belirteç olarak kabul edilmektedir (89). Çeşitli araştışıcılar infertil hastaların seminal plazmasında PK düzeylerinin yüksek olduğunu bildirmişlerdir (12,89,90).

2.8.1.3. DNA Oksidasyonu

Serbest radikallerin etkisi ile nükleik asitlerde de yapısal değişimler olmaktadır. Bu yapısal değişimler DNA' da abazik bölgelerin oluşması, baz katılımı veya bazlarda yeniden düzenlenmeler gibi baz değişiklikleri, tek ve çift zincir kırıkları, DNA ile protein arasında çapraz bağlanmalar olarak sıralanabilir (91). ROS' un DNA'da 20' den fazla baz hasarına yol açtığı bildirilmiştir. Guanin, oksidatif DNA hasarına en duyarlı olan bazdır. Bu nedenle 8-hidroksi-2'- deoksiguanozin (8-OHdG) en bol miktarda oluşan ve etkileri en çok incelenmiş olan baz hasarıdır (92). 8-OHdG enzimatik olarak kesilip çıkarılarak DNA tamir edildikten

sonra daha ileri bir işleme uğramadan serum, idrar veya diğer ekstrasellüler sıvılara atılır. İdrardaki 8-OHdG ölçümünün bütün vücuttaki ortalama oksidatif DNA hasarını gösterdiği düşünülmektedir (92,93). Seminal plazmadaki 8-OHdG düzeyi de spermdeki oksidatif DNA hasarının göstergesi olarak kullanılabilirliği konusunda kısıtlı sayıda çalışma mevcuttur (12).

2.8.2. Nitrozatif Stres Göstergeleri

2.8.2.1. Nitrik Oksit

NO yarı ömrü çok kısa ve son derece kararsız bir moleküldür. Hızla oksidatif degradasyona uğrar ve dolayısıyla direkt olarak ölçümü pratikte mümkün değildir. NO hızla nitrit ve nitrata dönüştüğünden NO ölçüm yöntemleri bu iki ürün üzerinden yapılır (94,95). NO için diğer bir yöntem NO'yu sentezleyen nitrik oksit sentaz (NOS)'ın aktivitesinin ve ekspresyonunun gösterilmesidir (96).

2.8.2.2. Nitrotirozin

NO'nun süperoksit anyonu ile reaksiyona girmesi sonucu daha toksik bir anyon olan peroksinitrit meydana gelmektedir (13,97). Peroksinitritin lipit peroksidasyonunda artışa ve total tiyol gruplarında azalmaya neden olarak sperm fonksiyon bozukluğuna yol açtığı gösterilmiştir (98). Peroksinitritin proteinlerle olan başlıca reaksiyonu ise aromatik amino asitlerin (tirozin, triptofan, fenilalanin) nitrasyonu reaksiyonudur. Peroksinitrit veya diğer potansiyel nitratlayıcı ajanların etkisiyle özellikle proteinlerdeki tirozin amino asidi nitrasyona uğrar ve sonuçta 3-nitrotirozin (NT) oluşur (97). NT, nitrozatif stresin stabil bir göstergesidir. Proteinlerdeki tüm amino asitler teorik olarak nitrasyon için hedef olabilirken, özellikle tirozin nitrasyonu, lokal ROS üretimi, antioksidanların varlığı, inflamatuvar hücre birikimi ve proinflamatuvar sitokinlerin varlığı gibi çeşitli koşullardan etkilenmektedir.

2.9. Serbest Oksijen Radikallerine Karşı Savunma Mekanizmaları

2.9.1. Antioksidan Etki Tipleri: Antioksidanlar dört ayrı mekanizma ile etki ederler.

2.9.1.1. Toplayıcı etki (Scavenging etki): Serbest oksijen radikallerini tutma ya da çok daha zayıf yeni bir moleküle çevirme işlemine “toplayıcı etki” denilmektedir. Bilirubin, antioksidan enzimler, trakeobronsiyal mukus ve küçük moleküller bu tür bir etki göstermektedirler (99,100).

2.9.1.2. Bastırıcı etki (Quencher etki): Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip, onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltan ya da inaktif biçime dönüştüren etki “bastırıcı etki” olarak adlandırılmaktadır. Vitaminler, bu tip bir etkiye sahiptirler. Bilirubin bu tarz antioksidan etkisi de vardır (99,101).

2.9.1.3. Zincir kırıcı (Chain-breaking etki): Serbest oksijen radikallerine bağlanarak zincirlerini kırıp işlevlerini engelleyici etkiye “zincir kırıcı etki” denir. Bilirubin, hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller zincir kırıcı etki gösterirler (99,102).

2.9.1.4. Onarıcı etki (Repair etki): Hasar görmüş DNA molekülünü tamir eden enzimler bu gruba örnek olarak verilebilir (99,103,104).

2.9.2. Antioksidan Sistemler

Vücutta reaktif oksijen türlerinin düzeylerini kontrol altında tutmak ve oluşturabilecekleri hasarları engellemek için farklı savunma mekanizması vardır (105,106). Serbest radikalleri metabolize eden, serbest radikal oluşumunu engelleyen veya serbest radikallerin temizlenmesini arttıran bu maddelere antioksidan maddeler denilmektedir. Antioksidanlar, peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyerek ya da reaktif O₂ türlerini toplayarak lipid peroksidasyonunu engellemektedirler. Aerobik hücrelerde birçok antioksidan sistem bulunmaktadır. Bu antioksidanlar endojen ve eksojen kaynaklı olarak iki gruba ayrılmaktadır (99,106-108).

Endojen antioksidanlar iki gruptur. Enzim olarak görev yapanlar ve enzim olmayan antioksidanlar olarak ayrılmaktadırlar. Enzim olan antioksidanlar; süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), glutatyon transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR) ve mitokondrial oksidaz sistemidir. Enzim olmayanlar ise; bilirubin, albumin, ürik asit, α-tokoferol, askorbik asit, seruloplazmin, transferrin, ferritin ve glutatyon gibi maddelerdir. Bunlar oksijen radikallerine karşı ilk savunma sistemini oluşturmaktadırlar (101,106, 109,110). Eksojen antioksidan olarak da allopurinol, folik asit, C vitamini, E vitamini, asetilsistein, mannitol, adenzin, kalsiyum kanal blokerleri, non steroid antiinflamatuvar ilaçlar ve demir şelatörleri sayılabilir (99,106). Antioksidanlar ayrıca primer, sekonder ve tersiyer olarak da gruplandırılmaktadır. Primer antioksidanlar, yeni serbest radikal oluşumunu önleyen

antioksidanlardır. Örnek olarak SOD, GPx, metal bağlayan proteinler, ferritin, seruloplazmin, demir, hemopeksin, haptoglobulin sayılabilir. Bazıları ise metal iyonları ile reaksiyona girebilecek olan peroksitleri yok ederek serbest radikallerin oluşumunu önlemektedirler (111). Zincir kırıcı reaksiyon ile serbest radikalleri uzaklaştıran antioksidanlar ise sekonder antioksidanlar olarak tanımlanırlar. Bilirubin, E vitamini, C vitamini, β -karoten, ürik asit ve albumin gibi maddeler bu grupta yer almaktadırlar. α -tokoferol lipid peroksidasyon zincirini kıran bir antioksidandır ve hücre zarında bulunmaktadır. Askorbik asit suda erimekte ve radikal toplayıcı olarak görev almakta, E vitamininin etkisini arttırmaktadır. Ürik asit ksantin oksidazı inhibe ederek serbest radikal oluşumunu azaltmaktadır (112). Serbest radikaller tarafından hasar gören biyomolekülleri onaranlar ise tersiyer antioksidanlardır. DNA'yı onaran enzimler bu grupta yer almaktadır.

2.9.3. Enzimatik Antioksidanlar

2.9.3.1. Superoksit Dismutaz

Substrat olarak serbest oksijen radikallerini kullanan SOD, süperoksiti hidrojen perokside çeviren bir metalloenzimdir. Bu reaksiyon “oksidatif strese karşı ilk savunma” olarak da tanımlanmaktadır. Zincirleme radikal reaksiyonlarının güçlü başlatıcısı süperoksittir. Bu sistem sayesinde hücrel kompartmanlardaki süperoksit düzeyleri kontrol altında tutulmaktadır. Lösemi, iskemi, hepatit, müsküler distrofi, respiratuar distres sendromu, böbrek yetmezliği, Fankoni anemisi, akciğer enfeksiyonları ve motor nöron hastalıkları gibi serbest radikal açığa çıkaran olaylarda ve hastalıklarda koruyucu rol oynadığı düşünülmektedir (99,106,107,113,114). Aynı zamanda SOD, lipid peroksidasyonunu da engellemektedir. SOD aktivitesi, yüksek oksijen kullanan dokularda fazladır. SOD' nin ekstrasellüler aktivitesi çok düşüktür (99). Murawski ve arkadaşları seminal plazmadaki SOD aktivitesi ile semen kalitesi, sperm, konsantrasyonu ve motilite arasında pozitif bir korelasyon olduğunu göstermiştir (115). Ayrıca oligoastenozoospermik hastalarda SOD aktivitesinin daha düşük olduğu bildirilmiştir.

2.9.3.2. Katalaz

CAT peroksizomlarda bulunan bir enzimdir. Fonksiyonu; hidrojen peroksidi su ve oksijene ayırtmaktadır. Katalaz yapısında protoporfirin-IX, Fe (Hem) grubu içerir. Kan,

kemik iliği, karaciğer, böbrek ve mukoz membranda fazla miktarda bulunmaktadır. CAT bulunduğu hücreye karşı koruyucu etkisi vardır (106,113). CAT aktivitesi hem spermatozoada hem de seminal plazmada saptanmıştır. Vazektomili olguların seminal plazmalarında katalaz aktivitesinin vazektomili olmayan kişilerle benzer sonuçlar göstermesi katalazın orijininin testis veya epididim olmadığını düşündürmektedir (95).

2.9.3.3. Glutasyon Peroksidaz

GPx, birçok hücrede sitozolde bulunan bir enzimdir. Görevi; sitozol ve mitokondrilerde SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksit ve yağ asidi hidroperoksitlerini ortadan kaldırmaktır. Fakat kapasitesi sınırlıdır. Düşük hidrojen peroksit konsantrasyonunda çalışmaktadır. Kofaktörü selenyum elementidir (99,107,113). Hidrojen peroksit ve organik peroksitlerin indirgenmesiyle oksitlenen glutasyon, glutasyon redüktaz enzimi ve başlıca pentoz fosfat yolundan sağlanan NADPH yardımıyla indirgenerek reaksiyonların devamını sağlar (114). GPx fagositik hücrelerde önemli görevlere sahiptir. Diğer antioksidanlarla birlikte GPx, solunum patlaması sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu, fagositik hücrelerin zarar görmesini önler. Eritrositlerde de GPx oksidan strese karşı en etkili antioksidanlardır. GPx aktivitesindeki azalma, hidrojen peroksidin artmasına ve şiddetli hücre hasarına sebep olur (116).

2.9.3.4. Glutasyon-S-Transferazlar

Organizmaya giren ksenobiyotiklerin biyotransformasyonunda rol oynamaktadırlar. Başta araşidonik asit ve linoleat hidroperoksitleri olmak üzere lipit hidroperoksidlere karşı glutasyon-S-transferazlar “selenyum” bağımsız aktivite göstermektedirler. Antioksidan aktivitelerine ek olarak başka biyokimyasal fonksiyonlara da sahip olup bilirubin, hem ve bazı kortikosteroidler gibi endojen maddelere geri dönüşümsüz olarak bağlanarak bunların hücre içi taşımasında da rol almaktadırlar (99).

2.9.3.5. Glutasyon Redüktaz

GPx tarafından hidrojen peroksit ve diğer lipit peroksitlerin yükseltgenmesi sırasında glutasyon, okside glutatona dönüşmektedir. Oksidasyona uğramış bu yapıyı tekrar kullanmak için redükte glutatona dönüştüren enzim glutasyon redüktazdır (99).

2.9.3.6. Mitokondrial Sitokrom Oksidaz

Solunum zincirinin son enzimi olan sitokrom oksidaz süperoksit radikalini suya çevirerek etki göstermektedir (99).

2.9.4. Total Antioksidan Seviye

Normal fizyolojik koşullarda organizma, endojen veya eksojen nedenlerle oluşan serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan savunma sistemine sahiptir. Vücudun oluşan oksidan durumlara karşı redoks ayarını sürdürebilmesinde kan önemlidir. Çünkü kan antioksidanların vücudun tüm bölümlerine taşınmasını ve dağıtımını gerçekleştirmektedir (117). Plazmadaki antioksidan moleküller, total antioksidan kapasiteye büyük katkıda bulunurlar. Plazmada serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin, ürik asit, bilirubin, E vitamini, C vitamini gibi proteinlere ek olarak serbest radikalleri tutan zincir kırıcı antioksidanlarda bulunmaktadır (102,118).

2.9.5. Paraoksonaz-1 Enzimi

PON1, 354 aminoasitli glikoprotein yapısında ve üç aktiviteli bir enzim olup kodlayan geni 7. kromozomun q21-22 bölgesine yerleşmiştir. Bunlar paraoksonaz, arilesteraz ve diazoksonazdır. Paraoksonaz (PON1, EC.3.1.8.1) kolinesterazların güçlü inhibitörü olan paraoksonu hidroliz edebilen, arildialkilfostafaz sınıfı bir ester hidrolaz enzimidir. Enzim aktivitesi kalsiyuma bağımlıdır. Paraoksonaz polimorfizm gösteren bir enzim olup; enzim aktivitesi yüksek ve düşük aktiviteli iki allelin genetik kontrolü altındadır. İnsan serum PON1 enzimi HDL ile ilişkili, antioksidan fonksiyona sahip olduğu kabul edilen bir enzimidir. Deneysel çalışmalarda PON1 enziminin HDL-kolesterol'un Apo-A1 ve Apo-J (Clustrein) proteinleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (119-121). Paraoksonaz gen ailesinin PON1, PON2 ve PON3 olmak üzere üç tipi vardır. PON2 ve PON3 105. pozisyonda lizin rezidüsü bulunmadığından paraoksonu hidroliz edemez ve plazmada bulunmazlar (122). PON1'in, LDL-kolesterolü Cu iyonu ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan koruyarak antioksidan fonksiyonunu yerine getirdiği düşünülmektedir (121,123). En belirgin etkisini, ileri düzeyde değişikliğe uğramış LDL'deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri hidroliz

ederek gösterir. Ateroskleroz gelişiminde rol alan oksidatif stres altında oluşan hidrojen peroksiti %25 oranında hidroliz eder. Bu özellik PON1'in peroksidaz aktivitesine sahip olduğunu göstermektedir (124). PON1 enzim aktivitesinin; miyokard enfarktüsü, ailesel hiperkolesterolemi, diyabet ve kronik renal bozukluklarda azaldığı pek çok çalışma ile gösterilmiştir (125,126). Fare testis spermatogonialarında PON1, PON2 ve PON3 olduğu, sertoli ve Leydig hücrelerinde PON1 ve PON3 olduğu gösterilmiştir (127). PON1 aktivitesinin düşüklüğü anormal sperm parametrelerine yol açacağı gösterilmiştir (128).

2.9.5.1. Paraoksonaz-1 Enziminin Yapısı

İnsan serum PON1 enzimi; karaciğerde sentezlenen, arildialkilfosfataz olarak da adlandırılan Ca bağımlı ve 43-45 kDa molekül ağırlıklı bir ester hidrolazdır (122,129). Ca, enzimin hem aktivitesi hem de stabilitesi için gerekmektedir ve katalitik 21 mekanizmada da rol almaktadır. Aktif bölgeden dietilfosfatın uzaklaştırılması bu bölgenin uygun konformasyonel yapı kazanmasına neden olur (125). PON1'in yapısında bulunan N-terminal hidrofobik sinyal peptidi, HDL ile etkileşim için gerekmektedir. PON1 enzimi N36 terminalhidrofobik sinyal peptidi aracılığı ile fosfolipitlere ve lipoproteinlere bağlanır (130,131). PON1 enzimi testis, karaciğer, böbrek, ince bağırsak başta olmak üzere birçok dokuda ve serumda bulunur (122,132). Genetik olmayan faktörler; diyet, akut faz reaktanları, gebelik, hormonlar, sigara kullanımı ve simvastatin tedavisi serum PON1 düzeyini etkiler (133,134). Ayrıca yapılan farklı bir çalışmada ise, yaş ile PON1 enzim aktivitesi arasındaki ilişki araştırılmış ve PON1 enzim aktivitesinin yaşın artışıyla ilişkili olarak azaldığına dikkat çekilmiştir (144). Son yıllarda, sigara kullanımının enzimin serbest tiyol gruplarını modifiye ederek; PON1 enzim aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (120). PON1 enzim aktivitesi, genellikle paraoksonun substrat olarak kullanıldığı yöntemler ile ölçülür.

2.9.5.2. Paraoksonaz Enziminin Fonksiyonu

Serum PON1 enziminin, aromatik karboksilik asid esterleri ve paraokson, diazookson, sarin, soman gibi organofosfat türevlerini detoksifiye ettiği pek çok çalışma ile göstermiştir (122,133). PON1 enzimi, paraoksondaki organofosfat ester bağının hidrolizinden sorumlu olan esterazdır (136). Son yıllarda PON1'in ayrıca laktonaz, siklik karbonat esterleri ve farmakolojik ajanları da hidroliz ettiği gösterilmiştir (129). HDL, LDL'yi oksidasyondan koruyabilmektedir. Çeşitli mekanizmalar bu koruyucu rolün açıklanmasında önem

kazanmaktadır. HDL ile ilişkili enzimlerin [PON1, Trombosit Aktive Edici Faktör Asetil Hidrolaz (PAF-AH)] oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır (122,133). PON1; LDL kolesterolü, Cu iyonunun ve serbest radikallerin indüklediği oksidasyondan korumaktadır (123). HDL kolesterol yapısında bulunan PON1 enzimi, minimal modifiye LDL'deki aktif lipidleri yıkar ve böylece arter duvarında yer alan hücrelerde enflamatuar cevap oluşumuna karşı koruyucu etki gösterebilir (137,138). PON1 lipit peroksidlerinin aterojenik etkilerini nötralize eder, hücre membranlarını koruyucu etki gösterir (139). Yapılan bir çalışmada, PON1'in arilesteraz aktivitesinin, LDL oksidasyonu esnasında yaklaşık %50 oranında azaldığı gösterilmiştir. LDL'yi oksidasyona karşı koruyan PON1 enzimi okside LDL oluşumu esnasında zamana bağlı olarak inaktive olmaktadır. Bu olayın mekanizması henüz açıklanamamıştır. Oksidatif sistemdeki Cu+1/Cu+2 iyonlarının oksidasyon esnasında PON1'in paraoksonaz/arilesteraz aktivitesi için gerekli olan Ca iyonunun yerine geçmesi, PON1' i kısmen inaktive etmektedir. Bir çalışmada, hidrojen peroksidin PON1'in güçlü inaktivatörü olduğu gösterilmiştir (140). PON1 organofosfat hidrolizini gerçekleştirebilmek için Ca gerekirken; lipit peroksidasyonundan koruyucu antioksidan aktivitesi için Ca gerekmez (140,141).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereçler

Kullanılan Gereçler

Steril semen toplama kabı
Nüve EN 400 marka etüv
Nüve NF 615 marka santrifüj
Otomatik pipet
Lam
Makler Counting Chamber Sefi-Medical Instrumentes Ltd.
Ph paper
Kronometre
Dikey şale
Spermac Stain Fixatuer
Spermac Stain Colorant A
Spermac Stain Colorant B
Spermac Stain Colorant C
Kurutma kağıdı
Olympus CX21 Binokuler Mikroskop
Enjektör
Biyokimya Cihazı (Roche(Almanya)/Cobas İntegra 800)
Biyokimya otoanalizoru (abbott c 4000)
Santrifüj (Heraeus)
Derin dondurucu (-20°C Uğur)
Soğutmalı Santrifüj
Manyetik Karıştırıcı
Distile su cihazı
Deiyonize su cihazı
Hassas terazi
-80° derin dondurucu

3.2. Yöntem

Çalışmanın yapılabilmesi için Harran Üniversitesi Etik Kurulu'na çalışma hakkında ayrıntılı bilgi verilerek 08.10.2013 tarih ve 09 nolu oturum 16 sayılı kararı ile onay alındı. Çalışmamız Harran Üniversitesi Bilimsel Araştırma Koordinasyon Kurulu tarafından 13144 nolu proje kararı ile desteklenmiştir.

Çalışmamız Kasım 2013-Mayıs 2014 tarihleri arasında infertilite tanısı ile Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Üroloji Anabilim Dalı Polikliniğine, infertilite nedeniyle başvuran bireylere çalışmayla ilgili ayrıntılı bilgi verilerek çalışmaya katılıp katılmayacağı soruldu. Çalışmaya katılmayı kabul edenlere aydınlatılmış onam formu okutuldu, dolduruldu ve ardışık 200 hasta alındı.

Hastaların fertilitate potansiyellerini etkileyebilecek faktörleri de içeren detaylı öyküleri elde edildi. Genital konjenital ve/veya edinsel malformasyonlar ile sekonder seks karakterlerine yoğunlaşan fizik muayeneleri yapıldı. Ayrıntılı anamnez ve fizik muayene sonrası erkek faktör infertiliteyi araştırmak için spermiogram istendi. Semen örneği 3 günlük cinsel perhiz sonrası steril toplama kabına masturbasyon yöntemi ile kayganlaştırıcı kullanılmadan alındı. Alındıktan hemen sonra 37°C deki etüve yerleştirildi. 45 dakika dinlendirildikten sonra otomatik pipet yardımı ile hacmi hesaplandı. Macles kameraya bir damla damlatılarak mikroskopta X20 büyütmede incelenerek sayı, motilite ve lökositine bakıldı. Lamel üzerine bir damla semen örneği damlatılıp lamel yardımı ile yayma yapıldı. Oda havasında 5 dakika kuruttuktan sonra Spermac Stain Fixatuer'de 10 dakika bekletildikten sonra Spermac Stain Colorant A solüsyonuna alındı 2 dakika bekletilip distile su ile yıkandı ve Spermac Stain Colorant B solüsyonuna alındı 2 dakika bekletilip distile su ile yıkandı ve Spermac Stain Colorant C solüsyonuna alındı 2 dakika bekletilip distile su ile yıkandı. Ardından oda havasında kurumaya bırakıldı. Kuruduktan sonra mikroskopta x100 büyütmede morfolojileri incelendi.

Semende anlamlı düzeyde lökosit tespit edilen hastalar; 40 yaş üstü, VKI >30, varikozel, epididimiorşit, testiküler torsiyon, testis travması ve tümörü olan hastalar; pentoksifilin, vitamin preparatları ve sigara kullanan hastalar semen oksidatif parametreleri etkilemesi muhtemel durumlar olduğundan çalışma dışı bırakıldı. Bu değerlendirme sonucu

azoospermik olan ve azoospermik olmayan semen olarak iki grup oluşturuldu. Semen örnekleri dakikada 3000 devir olacak şekilde 15 dakika santrifüj edildikten sonra -80°C de çalışma gününe kadar saklandı.

Çalışmaya dahil edilen katılımcılardan en az 12 saatlik açlık sonrası sabah 9:00 ile 11:00 saatleri arasında paraoksonaz, arilesteraz, TOS, TAS, OSİ düzeyleri çalışılmak üzere oturur pozisyonda venöz (antekübital ven) kan örnekleri alındı. Serum analizleri için alınan kan örnekleri pıhtı aktivatörü içeren jel seperatörlü kuru biyokimya tüplerine hemoliz oluşturmadan boşaltıldı. Biyokimya tüplerine alınan kanlar pıhtılaşması için oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum örnekleri ayrıldı. Elde edilen serum örnekleri bekletilmeden -80°C'de analiz yapılıncaya kadar saklandı. Sperm ve kan toplama tamamlandıktan sonra analizden hemen önce dondurulmuş örnekler aşamalı olarak çözündürüldü. Harran Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda paraoksonaz, arilesteraz, TAS, TOS, OSİ çalışıldı.

3.3. Analitik Metodlar

3.3.1. Total Oksidatif Seviye Düzeyi Ölçümü

Seminal plazma TOS düzeyi Erel tarafından geliştirilen ticari Rel Assay kitleri ile çalışıldı. TOS düzeylerini ölçmek için, testin çalışma prensibinde ifade edildiği üzere örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntem kullanıldı. Sonuçlar $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 / \text{L}$ olarak verildi (142).

3.3.2. Total Antioksidan Seviye Düzeyi Ölçümü

Seminal plazma TAS düzeyi Erel tarafından geliştirilen ticari Rel Assay kitleri ile çalışılmıştır. Erel tarafından geliştirilen bu yöntem tam otomatik olup, güçlü serbest radikallere karşı vücudun total antioksidan kapasitesini ölçen bir metoddur. Örneklerin TOS düzeyi ölçüm yöntemi, örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS* katyonik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikalini antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır (143). Kalibratör olarak E vitamini suda çözünür bir analogu olan Trolox kullanılır. Sonuçlar $\text{mmol Trolox Equvalent} / \text{L}$ olarak ifade edilir.

3.3.3. Oksidatif Stres İndeksi Ölçümü

Örneklerin oksidatif stres indeksi, örneklerin toplam oksidan status düzeylerinin, örneklerin toplam antioksidan seviye oranına yüzdesi olarak belirtilir (144). Hesaplamadan önce TAS testinin birimindeki mmol değeri TOS testindeki gibi mikromol birimine çevrilir.

3.3.4. Paraoksonaz Enzim Aktivitesi Ölçümü

HDL-Kolesterole bağlı lipofilik, hidrofobik yapılı antioksidan bir enzim olan paraoksonaz aktivitesi ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Yöntemde paraoksonaz enzimi paraoxon (O,O-diethyl-O-pnitrophenylphosphate) substratını hidroliz ederek renkli pnitrophenol ürününün oluşmasına yol açar. Oluşan ürünün absorbansı 412 nanometre (nm) de kinetik modda izlenerek enzim aktivitesi U/L olarak ifade edilir (145).

3.3.5. Arilesteraz Enzim Aktivitesi Ölçümü

Antioksidan bir enzim olan paraoksonaz enziminin arilesteraz aktivitesi de ticari Rel Assay marka kit kullanılarak ölçüldü. Bu test, örneğin içerdiği enzim tarafından fenilasetat substratından enzimatik aktiviteyle açığa çıkarılan fenolün, kolorimetrik olarak ölçülmesi esasına dayanır (146). Sonuçlar enzim aktivitesi çok yüksek düzeylerde olduğu için kU/L olarak ifade edilir.

3.4. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analizler SPSS Versiyon 15 (SPSS Inc. Chicago USA) bilgisayar programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Grup değişkenlerinin dağılımı Student's t testi ile karşılaştırıldı. Parametreler arasındaki ilişki Pearson korelasyon analizi ile değerlendirildi. Sonuçlar ortalama \pm standard deviasyon olarak belirtildi ve P değerinin 0.05 den küçük olması anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Azoospermik grupta (n=48) ortalama yaş 32.40±8.01 yıl, vücut kitle indeksi (VKI) 25.46±3.46 kg/m², evlilik süreleri 5.21±4.33 yıl iken nonazoospermik grupta (n=137) ortalama yaş 30.58±5.77 yıl, VKI 25.70±3.32 kg/m², evlilik süreleri 4.94±3.73 yıl idi. Gruplar arasında bu parametreler açısından istatistiksel fark yoktu.

Azoospermik ve nonazoospermik gruplarda TAS, TOS, OSİ, PON, arilesteraz seviyeleri incelendiğinde; azoospermik olmayan grupta TAS, PON, arilesteraz değerlerinin azoospermik gruptaki değerlerden istatistiksel olarak daha yüksek olduğu TOS ve OSİ değerlerinin düşük olduğu bulundu. Bütün farklar istatistiksel olarak anlamlıydı (Tablo 3).

Nonazoospermik grupta semen hacmi, mililitrede sperm sayısı, motilitesi ve morfololisi ile TAS, TOS, OSİ, PON, arilesteraz değerleri arasındaki ilişki incelendi. Semen hacmi ile OSİ arasında negatif korelasyon belirlendi (r=-345, P<0.005). Oksidasyonun diğer parametreleri ile herhangi bir anlamlı ilişki saptanmadı. Mililitrede sperm sayısı ile PON (r=409, P<0.001) ve arilesteraz (r=466, P=0.000) arasında pozitif korelasyon belirlendi. Çalışılan diğer parametreler ile anlamlı bir ilişki bulunamadı. Motilite ile sadece OSİ arasında negatif korelasyon bulundu ancak bu ilişki istatistiksel olarak anlamlı değildi (r=-0.64, P=0.586). Morfoloji ile OSİ arasında negatif korelasyon belirlendi (r=-335, P<0,005). Morfoloji ile diğer parametreler arasında ise başka bir ilişki saptanmadı.

Tablo 3. Azoospermik ve non azoospermik gruplarda seminal plazma oksidatif/antioksidatif parametreler

	Azoospermik Grup (n=48)	Non Azoospermik Grup (n=137)	P
TAS (mmol Trolox Equivalent / L)	0.36±0.08	0.49±0.07	0.001
TOS (µmol H₂O₂ /L)	5.02±1.34	2.25±0.08	0.000
OSİ	1.36±1.81	0.73±0.65	0.005
PON (U/L)	1.16±0.30	1.40±0.42	0.004
Arilesteraz (kU/L)	0.50±0.15	0.61±0.16	0.001

Azoospermik ve non azoospermik grupta kan lipid profili çalışıldı. Lipit profili ile serum TAS, TOS, OSİ, PON, arilesteraz değerleri Tablo 4’de karşılaştırmalı olarak gösterildi. Her iki grup arasında kan lipid değerleri açısından istatistiksel farklılık yoktu. Azoospermik hastalarda serum oksidatif parametreler (TOS ve OSİ) non azoospermik gruptan daha yüksek, buna karşılık antioksidan parametreler (TAS, PON ve arilesteraz) daha düşük bulundu. Tüm farklar istatistiksel olarak anlamlıydı.

Tablo 4. Azoospermik ve non azoospermik gruplarda kan lipid profili ve serum oksidatif/antioksidatif parametreleri

	Azoospermik Grup (n=48)	Non Azoospermik Grup (n=137)	P
Total kolesterol (mg/dL)	171.5±26.2	173.1±27.3	0.763
LDL kolesterol (mg/dL)	106.0 ± 27.7	105.4 ± 23.0	0.771
HDL kolesterol (mg/dL)	43.9 ± 4.6	44.5 ± 4.9	0.811
Trigliserid (mg/dL)	116.2 ± 24.6	119.2 ± 27.4	0.745
TAS (mmol Trolox Equivalent / L)	1.22±0.15	1.27±0.14	0.045
TOS (µmol H₂O₂ /L)	14.39±3.72	11.29±3.57	0.000
OSİ	1.20±0.40	0.89±0.27	0.000
PON (U/L)	73.86±16.72	89.56±22.49	0.001
Arilesteraz (kU/L)	100.82±31.25	113.53±31.80	0.032

Her iki grup kendi içinde değerlendirildiğinde serum ve seminal plazma örneklerinde oksidatif stres parametreleri anlamlı olarak farklı idi. Periferik kanda antioksidan göstergeler (TAS, PON ve Arilesteraz) seminal plazmadaki örneklerden daha yüksek iken oksidan parametreler olan TOS ve OSİ daha düşüktü.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda erkek infertilitesi alanında yapılan birçok çalışmada oksidatif stres üzerine yoğunlaşmıştır. Vücuttaki antioksidanlar ve serbest oksijen radikalleri arasındaki dengesizlik sonucu ortaya çıkan oksidatif stres, spermelere zarar verir ve infertiliteye sebep olabilir (147). Seminal plazmada lökositler (nötrofil ve makrofajlar), immatür ve hasarlı spermatozoalar serbest oksijen radikallerin başlıca endojen kaynaklarıdır (4,5). Seminal plazma serbest oksijen radikalleri ile indüklenmiş hasara karşı spermatozoayı koruyabilmek için güçlü bir antioksidan kapasiteye sahiptir (3). Bu koruyucu sistem serbest oksijen radikallerine bağlı zincirleme reaksiyonu durduran, oksidan radikalleri, toplayan veya nötralize eden antioksidan moleküller içerir.

İnfertil erkeklerin seminal plazmalarında serbest oksijen radikalleri ve antioksidan kapasite ile ilgili değişik veriler rapor edilmiştir. Sharma ve arkadaşları (147) normozoospermik infertil erkeklerde düşük TAS ve yüksek TOS rapor ederken Saleh ve arkadaşları (148) infertil erkek seminal plazmalarında TAS ve TOS seviyelerinde herhangi bir değişiklik bulamamışlardır. Shiva ve arkadaşları (149) azoospermik hastalarda oksidatif kapasiteyi düşük, antioksidant kapasiteyi ise yüksek bulmuşlardır. Çalışmamızdaki bulgulara göre azoospermik hastalarda total oksidatif kapasite oldukça yüksek, total antioksidant kapasite ise nispeten düşük bulunmuştur. Seminal plazmadaki temel oksidatif stres kaynaklarının lökositler ve immatür, defektli sperm hücrelerinin olduğu mevcut bilgisi göz önüne alındığında lökositolu olmayan azoospermik bireylerden oluşan grubumuzda semende TOS değerlerinin ve OSİ'nin düşük olması beklenirdi. Ancak non azoospermik grup semen örneklerine göre azoospermik grupta TOS'un ve OSİ'nin yüksek çıkması i) seminal plazmada oksidatif stres parametrelerini esas yükseltenin lökositler olduğu, defektli sperm varlığının oksidatif strese katkısının ihmal edilebilir düzeyde olduğu, dolayısıyla sperm yokluğunun da bu açıdan anlamlı bir fark oluşturmadığı; ii) normal spermelerin var olduğu seminal plazma örneklerinde antioksidanların artıp oksidanların düşmesi bulgusu sağlıklı spermelerin oksidatif dengeye anlamlı ölçüde katkı sağladığı; iii) serumdaki oksidatif dengenin lokosit ve sperm hücrelerinden çok daha güçlü olarak seminal plazma oksidatif dengesi üzerine belirleyici rolü olduğu varsayımları ile izah edilebilir. Bizim çalışmamızda azoospermik grupta serum oksidatif stres parametrelerinin diğer gruptan daha yüksek olduğu bulgusunun, bu grubun seminal plazma örneklerindeki beklenmedik şekilde diğer gruptan daha yüksek olan TOS ve OSİ'nin gerekçesi olabileceğine inanmaktayız. Sistemik enfeksiyon, depresyon ve stres gibi birbirinden farklı birçok klinik durumun kanda anlamlı oksidatif denge değişimlerine neden

olduğu gösterilmiştir (150-152). Bu klinik durumların birçoğu aynı zamanda erkek faktör infertilitesinin etiyolojik nedenleri arasında da karşımıza çıkmaktadır. Buradan hareketle serumda oksidatif stres bulgusu oluşturan patolojilerin seminal plazmayı, spermelerin üretim ve fonksiyonlarını da dolaylı olarak etkileyebileceğini söyleyebiliriz. Tersinden örnekler hali hazırda mevcuttur. Birçok çalışmada sistemik antioksidan dengenin düzeltildiği tedaviler ile sperm üretimi ve/veya fonksiyonlarının düzeltilebileceği gösterilmiştir (153,154).

Non azoospermik semende TAS'ın yüksek olmasının bir nedeni de matür sperm hücrelerinin antioksidan kapasiteye katkı sağlamış olmalarıyla izah edilebilir. Non azoospermik grupta antioksidan etkili PON ve arilesteraz seviyelerinin de yüksekliği dikkat çekmektedir. Ayrıca mevcut çalışmada sperm sayısı ile PON ve arilesteraz arasında pozitif korelasyon olması da bu kanaati güçlendirmektedir.

Semen parametreleri (volüm, sayı, morfoloji, motilite) ile TAS, TOS arasında ilişkiyi inceleyen çalışmalarda da farklı sonuçlar rapor edilmiştir. Bazı yazarlar infertil erkeklerin semen parametreleri ile TAS, TOS arasında bir ilişki bulamamışken (128,155), bazı yazarlarda ilişki olduğunu rapor etmişlerdir (156,157). Bizim alışmamızda nonazoospermik grupta semen hacmi ile OSİ arasında negatif korelasyonun varlığı dışında oksidasyonun diğer parametreleri ile herhangi bir anlamlı ilişki saptanmadı. Mililitrede sperm sayısı ile PON ve arilesteraz arasında pozitif korelasyon belirlenirken, çalışılan diğer parametreler ile anlamlı bir ilişki bulunamadı. Motilite ile OSİ arasında istatistiksel anlamlı olmayan negatif korelasyon dışında çalışılan diğer parametreler arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı. Morfoloji ile OSİ arasında negatif korelasyon belirlendi. Morfoloji ile diğer parametreler arasında ise başka bir ilişki saptanmadı. Çalışmamızda nonazoospermik hasta grubunda OSİ yüksekliği ile semen hacmi, sperm sayı ve morfolojisi arasında negatif korelasyonun belirlenmesi literatürde yer alan (4,5,156,157) oksidatif stresin sperm gelişimi ve fonksiyonlarını olumsuz etkilediği bilgisini desteklemektedir.

6. SONUÇ

Azoospermik bireyler diğer oligo ve normospermik infertil bireylere göre daha fazla serum ve seminal plazma oksidatif stres paterni göstermektedirler. Sperm hücresi ve/veya lökospemisi bulunmayan seminal örneklerden oluşan azoospermik grubumuzdaki yüksek TOS ve OSİ seviyelerinin varlığı, semende oksidatif stresi oluşturan başlıca faktörlerin lökosit ve/veya immatür, hasarlı sperm hücreleri olduğu yönündeki mevcut bilginin sorgulanması gerektiğini ve seminal oksidatif dengeyi bozabilen başka sebeplerinde olabileceğini düşündürmektedir. Bu konuyla ilgili daha geniş katılımlı ve iyi düzenlenmiş çalışmaların yapılması gerekliliği açıktır. Örneğin klinik bir gözlem olarak bildiğimiz, azoospermik ve/veya şiddetli oligozoospermik hastalarda daha yoğun yaşandığını bildiğimiz depresif duygu durumunun, sistemik oksidatif denge bozukluğu üzerinden de sperm parametrelerini etkileyebileceği savı, ileri araştırmayı gerektiren bir soru olarak önümüzde durmaktadır.

7. KAYNAKLAR

- 1) Moshcr WD, Pratt WF. Fecundity and infertility in the United States: incidence and trends. *Ferti Steril.* 1991; 56: 192-3.
- 2) Uysal M. Serbest radikaller ve oksidatif stres. *Biyokimya* (2nd ed.) Ed(s): Gürdöl F, Ademoğlu E. Nobel Tıp Kitabevleri, 2010; İstanbul, 647-52.
- 3) Tremellen K. Oxidative stress and male infertility a clinical perspective. *Hum Reprod Update.* 2008; 14: 243-58.
- 4) Mancini A, Festa R, Silvestrini A, Nicolotti N, Di Donna V, La Torre G, Pontecorvi A, Meucci E. Hormonal regulation of total antioxidant capacity in seminal plasma. *J Androl.* 2009; 30: 534-40.
- 5) Kothari S, Thompson A, Agarwal A, du Plessis SS. Free radicals: Their beneficial and detrimental effects on sperm function. *Indian J Exp Biol.* 2010; 48: 425-35.
- 6) Agarwal A, Makker K, Sharma R. Clinic relevance of oxidative stress in male factor infertility: An update. *Am J Reprod Immunol.* 2008; 59: 2-11.
- 7) Lavranos G, Balla M, Tzortzopoulou A, Syriou V, Angelopoulou R. Investigating ROS sources in male infertility: A common end for numerous pathways. *Reprod Toxicol* 2012. 34(3): 298-307
- 8) Davies MG, Fulton GI, Hagen PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surg.* 1995; 82: 1598-610.
- 9) Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal A. Should seminal oxidative stress measurement be offered routinely to men presenting for infertility evaluation? *Endocr Pract* 2008; 14: 484-91.

- 10) Köksal IT, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoğlu S, Kadioğlu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int.* 2000; 86: 549-52.
- 11) Köksal IT, Usta M, Orhan I, Abbasoğlu S, Kadioğlu A. Potential role of reactive oxygen species on testicular pathology associated with infertility. *Asian J Androl.* 2003; 5: 95-9.
- 12) Aktan G, Doğru- Abbasoğlu S, Başaran- Küçükgergin C, Kadioğlu A, Özdemirler- Erata G, Koçak- Toker N. Mystery of male idiopathic infertility: Is oxidative stress an actual risk? *Fertil Steril* 2013; 99: 1211-5.
- 13) Abd-Elmoaty MA, Saleh R, Sharma R, Agarwal A. Increased levels of oxidants and reduced antioxidants in semen of infertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 2010; 94: 1531-4.
- 14) Tvrdá E, Knazická Z, Bardos L, Massanyi P, Lukac N. Impact of oxidative stress on male infertility - a review. *Acta Veterinaria Hungaria.* 2011; 59: 465-84.
- 15) Nouri M, Ghasemzadeh A, Farzadi L, Shahnazi V, Novin MG. Vitamin C, E and lipid peroxidation levels in sperm and seminal plasma of asthenoteratozoospermic and normospermic men. *Iranian J Reprod Med.* 2008; 6: 1-5.
- 16) Muino-Blanco T, Perez-Pe R, Cebrian-Perez C. Seminal plasma proteins and sperm resistance to stress. *Reprod Dom Anim.* 2008; 43: 18-31.
- 17) Atig F, Raffa M, Ali HB, Abdelhamid K, Saad A, Ajina M. Altered antioxidant status and increased lipid peroxidation in seminal plasma of Tunisian infertile men. *Int J Biol Sci.* 2012; 8: 139-49.
- 18) Agarwal A, Sekhon LH. Oxidative stress and antioxidants for idiopathic oligoasthenoteratospermia: is it justified? *Indian J Urol.* 2011; 27: 74-85.
- 19) Hendin BN, Kollettis PN, Sharma RK, et al. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999; 161: 1831-4

- 20) Foresta C, Garolla A, Bartoloni L, Bettella A, Ferlin A. Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90: 152-6
- 21) Aydos K. Subfertil erkeğin değerlendirilmesi. İç: Kadıoğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği*; 2004. 74–172.
- 22) Aydos K. Erkek infertilitesi. İç: Anafarta K, Bedük Y, Arıkan N editörler. *Temel Üroloji 3. Baskı; Güneş Tıp Kitabevleri*; 2007. 967-1012
- 23) Turek P, Erkek infertilitesi. *Smith Genel Üroloji. 17. Baskı; Nobel Tıp Kitabevleri*: 2009. 684-716.
- 24) Davidoff M. S, Schulze W, Middendorff R, Holstein AF. The Leydig cell of the human testis – a new member of the diffuse neuroendocrine system, *Cell Tissue Res*, 1993; 271: 429-39
- 25) Holstein A. F. Schulze W. And Davidoff M. Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2003: 1: 107-8
- 26) Clermot Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972; 52(1): 198-236
- 27) Bras M, Lens JW, Piederiet MH, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. İvf Laboratory aspects of in vitro fertilization. *N.V. Organon*, 1996; 70-5
- 28) Delilbaşı L, Balaban B, Ayaş B. Gametler (sperm/oosit) fertilizasyon ve embriyoner gelişim. *Serano yayınları*, 2000. 01-2000.
- 29) Barrat CLR. Spermatogenesis. In: Grudzinkas JG, Yovich JL(eds): *Gametes- The Spermatozoon*. Cambridge, Cambridge University Pres, 1995. 250-67.

- 30) Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*. 2003; 59: 73-86.
- 31) Syed V, Hecht NB. Disruption of germ cell-Sertoli cell interactions leads to spermatogenic defects. *Mol Cell Endocrinol*, 2002. 186: 7-155.
- 32) Sairam MR, Krishnamurthy H. The role of Follicle-Stimulating Hormone in spermatogenesis: Lessons from knockout animal models. *Arch Med Res*. 2001; 32: 8-601.
- 33) Hedger MP, Meinhardt A. Cytokines and immune-testicular axis. *J Rep Immunol*. 2003; 58: 1-26.
- 34) Ross MH, Kaye GI, Pawlina W. *Histology: A Text and Atlas*, 4th edn, Lippincott Williams-Wilkins, Philadelphia; 2003. 689-96.
- 35) Print CG, Lakoski Loveland K. Germ cell suicide: New insights into apoptosis during spermatogenesis. *Bioessays*. 2000; 22: 423-30.
- 36) Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J. Aromatase expression in male germ cells. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*. 2001; 79: 203-8.
- 37) Niederberger CS, Lamb DJ. Spermatogenesis in the Adult. In: Lipshultz LI, Howards SS (eds), *Infertility in the Male*, 3rd edn. Mosby, St Louis, 1997. 106-22.
- 38) Hipler UC, Hochheim B, Knöll B, Tittelbach J, Schreiber G. Serum inhibin B as a marker for spermatogenesis. *Arch Androl*. 2001; 46: 217-22.
- 39) Wong WY, Flik G, Groenen PMW, Swinkels DW, Thomas CMG, Copius- Peereboom JHJ, Merkus HMWM, Steegers-Theunissen RPM. The impact of calcium, zinc, and Cooper in blood and seminal plasma on semen parameters in men. *Rep Toxicol*. 2001; 15: 131-6.
- 40) Cooke HJ, Hargreave T, Eliot DJ. Understanding the genes involved in spermatogenesis: A progress report. *Fertil Steril*. 1998; 69: 989-95.

- 41) Adler ID. Spermatogenesis and mutagenicity of environmental hazards: Extrapolation of genetic risk from mouse to man. *Andrologia*. 2000; 32: 233-7.
- 42) Gazvani MR, Wilson EDA, Richmond DH, Howard PJ, Kingsland CR, Lewis- Jones DI. Role of mitotic control in spermatogenesis. *Fertil Steril*. 2000; 74: 251-6.
- 43) Meistrich ML, Wilson G, Shuttlesworth GA, Porter KL. Dibromochloropropane inhibits spermatogonial development in rats. *Rep Toxicol*. 2003; 5515: 1-9.
- 44) Kayıgil Ö. Erkek infertilitesinde tanı yöntemleri. TÜYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Kongre Basımevi; 2006. 253-61.
- 45) Aşçı R. İnfertil çiftte erkeğin sorgulanması. Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı. 2008, 1(1): 1-6.
- 46) Çulha M. Erkek infertilitesinde tanı. TUYK Ders Notları Kitabı. Ankara: Ünal Ofset; 2007. 292-6.
- 47) Sabanegh E, Agarwal A. Erkek infertilitesi. İç: Louis RK, Alan WP, Andrew CN, Craig A, editörler. *Campbell Urology*. Güneş Kitabevi; 2012. 620-3.
- 48) Kandıralı E. Semen analizi ve sperm morfolojisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği*; 2004. 317-23.
- 49) WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th. ed, 2010; 21-6
- 50) Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best pract res clin endocrinol metab*. 2011; 25: 271-85
- 51) Ombelet W, Pollet H, Bosmans E, Vereecken A. Results of questionnaire on sperm morphology assessment. *Hum Reprod*. 1997; 12: 1015-20.

- 52) Kruger TF, Menkveld R, Stander FS, Lambard CJ, Van der Merwe JP, van Zyl JA, Smith K. Sperm morphology features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1986; 46: 118-23.
- 53) Pavlovich CP, King P, Goldstein M, Schlegel PN. Evidence of a treatable endocrinopathy in infertile men. *J Urol*. 2001; 165: 837-41.
- 54) Jarrow JP. Transrectal ultrasonography of infertile men. *Fertil Steril*. 1993; 60: 1035-9.
- 55) Turek PJ, Cha I, Ljung BM. Systematic fine-needle aspiration of the testis: correlation to biopsy and results of organ 'mapping' for mature sperm in azoospermic men. *Urology*. 1997; 49: 743-8.
- 56) Kefi A, Esen A. Testis biopsisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği*; 2004. 238-9.
- 57) De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studys in male infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991; 6: 245-50.
- 58) Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, Roberts KP. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*. 1997; 336: 534-9.
- 59) Aydos S. Erkek infertilitesi ve genetik. *Türkiye Klinikleri Üroloji Özel Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı*. 2008 1(1): 34-40.
- 60) Özgök Y. İnfertilite tedavisi. *TUYK Ders Notları Kitabı*; 2008. 299-305.
- 61) Çayan S. Erkek infertilitesinde medikal ve cerrahi tedavi. *TÜYK Ders Notları Kitabı*. Ankara: Kongre Basımevi; 2006. 262-3.
- 62) Biri H. Erkek infertilitesinde medikal ve cerrahi tedavi. *TUYK Ders Notları Kitabı*. Ankara: Ünal Ofset; 2007. 297-8.

- 63) Semerci B. Erkek infertilitesinin spesifik medikal tedavisi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004. 396-401.
- 64) Jungwirth A1, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. Eur Urol. 2012 Aug; 62(2):324-32.
- 65) Charny CW, Gordon JA. Testosterone rebound therapy: A neglected modality. Fertil Steril. 1978; 29: 64-8.
- 66) Lamensdorf H, Compere D, Begley G. Testosterone rebound therapy in the treatment of male infertility. Fertil Steril. 1975; 26: 46-72.
- 67) Wang C, Dahl KD, Leung A, Chan SY, Hsueh AJ. Serum bioactive folliclestimulating hormone in men with idiopathic azoospermia and oligospermia. J Clin Endocrinol Metab. 1987; 65: 627-33.
- 68) Acosta AA, Khalifa E, Oehninger S. Pure human follicle stimulating hormone has a role in the treatment of severe male infertility by assisted reproduction: Norfolk's total experience. Hum Reprod. 1992; 7: 1067-72.
- 69) Vigersky RA, Glass AR. Effects of delta-1-testolactone on the pituitaritesticular axis in oligospermic men. J Clin Endocrinol Metab. 1981; 52: 897-902.
- 70) Göğüş O. Ampirik medikal tedavi. İç: Özdiler E, Aydos K(ed). Klinik Androloji. Ankara Üniversitesi Basımevi. 2000. 597-612.
- 71) Schill WB. Treatment of idiopathic oligozoospermia by kallikrein: Results of double-blind study. Arch Androl. 1979; 2: 163-70.
- 72) Homonai ZT, Shilon M, Paz G. Evaluation of semen quality following kallikrein treatment. Jinecol Obstet Invest. 1978; 9: 132-8.

- 73) Keck C, Behre HM, Jockenhovel F. Ineffectiveness of kallikrein in treatment of idiopathic male infertility: A double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Hum Reprod.* 1994; 9: 325-9.
- 74) Bozkırlı İ. Erkek İnfertilitesi. Bozkırlı İ (eds), *Yeni Üroloji*. Türk Hava Kurumu Basımevi, Ankara. 1999, 583-602.
- 75) Bozkırlı İ, Tunç L. Erkek İnfertilitesinde Ampirik Medikal Tedavi. İç: Kadioğlu A, Çayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. *Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği*; 2004. 410-1.
- 76) Aydın S, İnci O, Alagöl B. The role of arginine, indomethacin and kallikrein in the treatment of oligoasthenospermia. *Int Urol Nephrol.* 1995; 27(2): 199-202
- 77) Dubin L, Amelar RD. Varicocelelectomy as therapy in male infertility: A study of 504 cases. *J Urol.* 1975; 113: 640-1.
- 78) Willis KC, London DR, Bevis MA. Hormonal effects of tamoxifen in oligospermic men. *J Endocrinol.* 1977; 73: 171-4.
- 79) Barkay J, Harpas-Kerpel S, Ben-Ezra S, Gordon S, Zuckermann H. The prostoglandin inhibitor effect of anti-inflammatory drugs in the therapy of male infertility. *Fertil Steril.* 1984; 42: 406-11.
- 80) Cohen MS, Colin MJ, Golimbu M. The effects of prostoglandins on sperm motility. *Fertil Steril.* 1977; 28: 78-85.
- 81) Tesarik J, Thebault A, Testart J. Effect of pentoxifiline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod.* 1992; 7: 1257-63.

- 82) Oktar T, Ahmedov İ, Kadioğlu A. Varikosel Tedavisi. İ: Kadioğlu A, ayan S, Semerci B, Orhan İ, Aşçı R, Yaman Ö, Usta MF, Kendrici M, editörler. Erkek Reprodüktif Sistem Hastalıkları ve Tedavisi: Türk Androloji Derneği; 2004. 463.
- 83) Aydos K. Erkeğin üremeye yardımcı teknikler için hazırlanması. Türkiye Klinikleri Üroloji Erkek İnfertilitesi Özel Sayısı.2008 1(1): 57-66.
- 84) Niki E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. Free Radic Biol Med. 2009; 47: 469-84.
- 85) Halliwell B, Chirico S. Lipid peroxidation: its mechanism, measurement and significance. Am J Clin Nutr. 1993; 57: 715-25.
- 86) Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): A brief overview. Chromatographia. 2012; 75: 433-40.
- 87) Davies SS, Roberts LJ. F2-isoprostanes as an iridicator and risk factor for coronary heart disease. Free Radic Biol Med. 2011; 50: 559-66.
- 88) Khosrowbeygi A, Zarghami N. Levels of oxidative stress biomarkers in seminal plasma and their relationship with seminal parameters. BMC Clin Pathol. 2007; 7: 1-6.
- 89) Aydemir B, Onaran İ, Kızıler AR, Alıcı B, Akyolcu MC. The influence of oxidative damage on viscosity of seminal fluid in infertile men. J Androl. 2008; 29: 41-6.
- 90) ELTaieb MAA, Henvig R, Nada EA, Greilberger J, Marberger M. Oxidative stress and epididymal sperm transport, motility and morphological defects. EJOG. 2009; 144: 199-203.
- 91) Agarwal A, Allamaneni SSR. Free radicals and male reproduction. J Indian Med Assoc. 2011; 109: 184-7.
- 92) Lau Li, Liu CJ, Wei YH. Increase of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in aqueous humor of patients with exudative age related macular degeneration. Invest Ophthal- mol Vis Sci. 2010; 51: 5486-90.

- 93) Loft S, Poulsen HE. Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products. *Acta Biochim Pol.* 1998; 45: 133-44.
- 94) Schmidt HHHW. Determination of nitric oxide via measurement of nitrite and nitrate in culture media. *Biochemica.* 1995; 2: 30.
- 95) Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol.* 2005; 43: 963-74.
- 96) Zini A, O'Bryan MK, Sclegel PN. Nitric oxide synthase activity in human seminal plasma. *Urology.* 2001; 58: 85-9.
- 97) Herrero MB, de Lamirande E, Gagnon C. Tyrosine nitration in human spermatozoa: a physiological function of peroxynitrite, the reaction product of nitric oxide and superoxide. *Mol Hum Rep.* 2001; 7: 913-21.
- 98) Öztezcan S, Türkoğlu ÜM, Kervancıoğlu E, Koçak T, Koçak-Toker N, Aykaç-Toker G. In vitro effects of peroxynitrite on human spermatozoa. *Andrologia.* 1999; 31: 195-8.
- 99) Akkus I. Serbest radikaller ve fizyopatolojik etkileri, Konya: Mimoza yayınları. 1995; 4-113.
- 100) Minetti M, Mallozzi C, Di Stasi A.M, Pietraforte D. Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys.* 1998; 352: 165-74.
- 101) Hegyi, T, Goldie E, and Hiatt M. The protective role of bilirubin in oxygen radical diseases of the preterm infant. *J. Perinatol.* 1994; 14: 296-300.
- 102) Stocker R, Yamamoto, A.F. McDonagh, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science.* 1987; 235: 4792, 1043-6.
- 103) Gopinathan V, N.J. Miller, A.D. Milner. Bilirubin and ascorbate antioxidant activity in

neonatal plasma. FEBS Lett. 1994; 349: 197-200.

104) Lindeman J.H, E.G. Lentjes, E. Houdkamp. Effect of an Exchange transfusion on plasma antioxidants in the newborn. Pediatrics. 1992; 90: 200-3.

105) Yesilkaya A, Altinayak R, and Korgun D.K. The antioxidant effect of free bilirubin on cumene-hydroperoxide treated human leukocytes. Gen Pharmacol. 2000; 35: 17-20.

106) Scandalios J.G, The rise of ROS. TRENDS in Biochemical Sciences. 2002; 27: 483-6.

107) Yiğit Ş, Yurdakök M. Yenidoğanlarda serbest radikallere bağlı hastalıklar. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 1997; 39: 749-65.

108) Cros, C.E. and B. Halliwell, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, Mccord JM, Harman D. Oxygen Radicals And Human Disease. Annals. Int. Med. 1987; 107: 526-45.

109) Gupta P, M. Narang, B.D. Banerjee. Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. BMC Pediatr. 2004; 4: 1-14.

110) Buhimschi I.A, C.S. Buhimschi, M. Pupkin. Beneficial impact of term labor: nonenzymatic antioxidant reserve in the human fetus. Am J Obstet Gyneco. 2003; 189: 181-8.

111) Halliwell B. and J.M. Gutteridge, The antioxidants of human extracellular fluids. Arch Biochem Biophys. 1990; 280: 1-8.

112) Tomaro ML and Batlle A M, Bilirubin: its role in cytoprotection against oxidative stress. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology. 2002; 34: 216-20.

113) Raha, S. and B.H. Robinson, Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. TIBS. 2000; 25: 502-7.

114) Peng T, Shen H, Liu ZM, Yan LN, Peng MH. Oxidative DNA damage in peripheral leukocytes and its association with expression and polymorphisms of hOGG1: A study of adolescents in a high risk region for hepatocellular carcinoma in China. World J

Gastroenterol. 2003; 9: 2186-93.

115) Murawski M, Saczko J, Marcinkowska A, Chwilkowska A, Grybooe M, Banaoe T. Evaluation of superoxide dismutase activity and its impact on semen quality parameters of infertile men. *Folia Histochem Cytobiol.* 2007; 45: 123-6.

116) Zhao, J, X.J. Liu, J.W. Ma, et al., DNA damage in healthy term neonate. *Early Hum Dev.* 2004; 77: 89-98.

117) Qanungo, S, A. Sen, and M. Mukherjea, Antioxidant status and lipid peroxidation in human fetoplacental unit. *Clin Chim Acta.* 1999; 285: 1-12.

118) Kiely M, P.A. Morrissey, P.F. Cogan, et al. Low molecular weight plasma antioxidants and lipid peroxidation in maternal and cord blood. *Eur J Clin Nutr.* 1999; 53: 861-4.

119) Kelso GJ, Stuart WD, Richter RJ, Furlong CE, Jordon-Starck TJ, Harmony JAK. Apolipoprotein J is associated with paraoxonase in human plasma. *Biochemistry.* 1994; 33: 832-9.

120) Mackness B, Hunt R, Durrington PN, Mackness MI. Increased immunolocalization of paraoxonase, clusterin and apolipoproteins A-I in the progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1233-8.

121) Canales A, Sanchez-Muniz FJ. Paraoxonase, something more than an enzyme *Med Clin (Barc).* 2003; 121: 537-48.

122) Mackness B, Durrington PN, Mackness MI. Human serum Paraoxonase. *Gen Pharm.* 1998; 3: 329-36.

123) Heijmans BT, Westendorp RGJ, Lagaay AM, Knook DL, Klufft C, Slagboom PE. Common paraoxonase gene variants, mortality risk and fatal cardiovascular events in elderly subjects. *Atherosclerosis.* 2000; 149: 91-7.

124) Otani, K. S. Shimizu, K.Chijjiwa. Increased Urinary Excretion of Bilirubin Oxidative

Metabolites in Septic Patients: A New Marker for Oxidative Stress in Vivo¹. *Journal of Surgical Research*. 2001; 96: 44–9.

125) Kwiterovich PO. The antiatherogenic role of high-density lipoprotein cholesterol. *Am J Cardiol*. 1998; 82: 13- 21.

126) Lee J, Prohaska JR, Thiele DJ. Essential role for mammalian copper transporter Ctr 1'in copper homeostasis and embryonic development. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98: 6842-7.

127) Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltran R, Joven J, Camps J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. *Free Radical Biol Med*. 2008; 45(2): 146–57.

128) Verit FF, Verit A, Ciftci H, Erel O, Celik H. Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. *J Androl*. 2009; 30(2): 183–9

129) Laytynen LA, Laytynen A, Haahtela T. Airway mucosal inflammation even in patients with newly diagnosed asthma. *Am Rev Respir Dis*. 1993; 147: 697-704.

130) Sorenson RC, Bisgaier CL, Aviram M, Hsu C, Billecke S, La du BN. Human serum paraoxonase/arylesterase's retained hydrophobic N-terminal leader sequence associates with HDLs by binding phospholipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19: 2214-25.

131) Sonmez H. Lipid metabolizmasının ana hatları, primer ve sekonder hiperlipidemiler. *Turkiye Klinikleri*. 2000; 13: 1-8.

132) Bin Ali A, Zhang Q, Lim YK, Fang D, Retnam L, Lim SK. Expression of major HDL associated antioxidant PON-1 is gender and regulated during inflammation. *Free Radic Biol Med*. 2003; 34: 824-9.

133) Maron DJ, Ridker PM, Pearson TA, Grundy SM. Dyslipidemia, other risk factors, and the prevention of coronary heart disease. Ch 38. In: Fuster V, Alexander RW, O'Rourke R. *Hurst's The Heart* 10th edn. McGraw- Hill Companies. USA. 2001; 1131-60.

- 134) Biasioli S, Schiavon R, Petrosino L, De Fanti E, Cavalcanti G, Battaglia P, Fasolin A. Paraoxonase activity and paraoxonase 1 gene polymorphism in patients with uremia. *ASAIO J.* 2003; 49: 295-9.
- 135) Seres I, Paragh G, Deschene E, Fulop T Jr, Khalil A. Study of factors influencing the decreased HDL associated PON1 activity with aging. *Exp Gerontol.* 2004; 39: 59-66.
- 136) Aviram M, Rosenblat M, Bisgair CL. Paraoxonase inhibits high density lipoprotein (HDL) oxidation and preserves its functions: a possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest.* 1998; 101: 1581-90.
- 137) Selek S, Cosar N, Kocyigit A, Erel O, Aksoy N, Gencer M, Gunak F, Aslan M. PON1 activity and total oxidant status in patients with active pulmonary tuberculosis. *Clinical Biochemistry.* 2008; 41: 140-4.
- 138) Erel O. A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *J. Clinical Biochemistry.* 2004; 37: 112-9.
- 139) Aviram M, Hardak E, Vaya J, Mahmood S, Milo S, Hoffman A, Billicke S, Draganov D, Rosenblat M. Human serum paraoxonases (PON1) Q and R selectively decrease lipid peroxides in human coronary and carotid atherosclerotic lesions. *Circulation.* 2000; 101: 2510-7.
- 140) Aviram M, Rosenblat M, Scott B, Eroglu J, Sorenson R, Bisgaier CI, Newton RS, La Du B. Human serum paraoxonase (PON 1) is inactivated by oxidized low density lipoprotein and preserved by antioxidants. *Free Rad Biol & Med.* 1999; 26: 892-904.
- 141) Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 473-80.
- 142) Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005; 38: 1103-11.
- 143) Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity

using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clinical Biochemistry*. 2004; 37: 277-85.

144) Harma M, Harma M, Erel O. Oxidative stress in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. 2005; 192: 656-7.

145) Eckerson HW, Wyte MC, La Du BN. The human serum paraoxonase/arylesterase polymorphism. *Am J Hum Genet*. 1983; 35: 1126–38.

146) Haagen L, Brock A. A new automated method for phenotyping arylesterase (E.C.3.1.1.2.) based upon inhibition of enzymatic hydrolysis of 4-nitrophenyl acetate by phenyl acetate. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 1992; 30: 391–5.

147) Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ Jr, Agarwal A. The reactive oxygen species–total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod* 1999; 14: 2801–7

148) Saleh RA, Agarwal A, Nada EA, El-Tonsy MH, Sharma RK, Meyer A, Nelson DR, Thomas AJ. Negative effects of increased sperm DNA damage in relation to seminal oxidative stress in men with idiopathic and male factor infertility. *Fertil Steril* 2003; 79: 1597–605

149) Shiva M, Gautam AK, Verma Y, Shivgotra V, Doshi H, Kumar S. Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clin Biochem*. 2011; 44(4): 319-24

150) Higashi Y1, Hoshijima M, Yawata T, Nobumoto A, Tsuda M, Shimizu T, Saito M, Ueba T. Suppression of oxidative stress and 5-lipoxygenase activation by edaravone improves depressive-like behavior after concussion. *J Neurotrauma*. 2014 May 21

151) Bhatt S, Radhakrishnan M, Jindal A, Devadoss T, Dhar AK. Neuropharmacological evaluation of a novel 5-HT₃ receptor antagonist (6g) on chronic unpredictable mild stress-induced changes in behavioural and brain oxidative stress parameters in mice. *Indian J Pharmacol*. 2014 Mar-Apr; 46(2): 191-6

- 152) Nobre LS, Saraiva LM. Role of the Siderophore Transporter SirABC in the *Staphylococcus aureus* Resistance to Oxidative Stress. *Curr Microbiol*. 2014 Mar 29.
- 153) Eroglu M, Sahin S, Durukan B, Ozakpinar OB, Erdinc N, Turkgeldi L, Sofuoglu K, Karateke A. Blood Serum and Seminal Plasma Selenium, Total Antioxidant Capacity and Coenzyme Q10 Levels in Relation to Semen Parameters in Men with Idiopathic Infertility. *Biol Trace Elem Res*. 2014 Apr 23
- 154) Kobori Y, Ota S, Sato R, Yagi H, Soh S, Arai G, Okada H. Antioxidant cosupplementation therapy with vitamin C, vitamin E, and coenzyme Q10 in patients with oligoasthenozoospermia. *Arch Ital Urol Androl*. 2014 Mar 28; 86(1): 1-4
- 155) Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril* 2000; 73: 459–64
- 156) Irvine DS, Twigg JP, Gordon EL, Fulton N, Milne PA, Aitken RJ. DNA integrity in human spermatozoa: relationships with semen quality. *J Androl* 2000; 21: 33–44
- 157) Moustafa MH, Sharma RK, Thornton J, Mascha E, AbdelHafez MA, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Relationship between ROS production, apoptosis and DNA denaturation in spermatozoa from patients examined for infertility. *Hum Reprod* 2004; 19: 129–38